

N° D'ORDRE

99

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Eugène CAPITAIN

Ingénieur Agricole
Professeur d'Agriculture

**1^{re} THÈSE : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE
ET PHYSIOLOGIQUE DES LEVURES DE POIRES**

2^e THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 20 Décembre 1930 devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *Président.*

ROMAN, *Examineur.*

DOUIN, —

FROMAGEOT,

LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1930



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION à l'ÉTUDE
MORPHOLOGIQUE et PHYSIOLOGIQUE des LEVURES de POIRES

N° D'ORDRE

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Eugène CAPITAIN

Ingénieur Agricole
Professeur d'Agriculture

**1^{re} THÈSE : CONTRIBUTION A L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE
ET PHYSIOLOGIQUE DES LEVURES DE POIRES**

2^e THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 20 Décembre 1930 devant la Commission d'examen

MM. CARDOT, *Président.*
ROMAN, *Examineur.*
DOUIN,
FROMAGEOT,

LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU
42, Quai Gailleton, 42

1930

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. GRIGNARD, O.,   I.,  P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale.*

Assesseur

M. VANEY,   I., .

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, O.,   I.;
GÉRARD, O.,   I.,  C.;
RIGOLLOT,   I.;
OFFRET,   I., ;
COUTURIER,   I., ;
KÖHLER, O.,   I., .



Professeurs titulaires

MM. GRIGNARD, O.,   I.,  P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale.*
DULAC,   I., *Calcul différentiel et intégral.*
MASCART,   I.,  *Astronomie physique.*
SIRE,  I.,  *Mécanique rationnelle et appliquée.*
MEUNIER, O.,   I., *Chimie industrielle.*
BEAUVÉRIE,   I.,  *Botanique.*
THOVERT,   I.,  *Physique.*
CARDOT,  *Physiologie générale et comparée.*
VANEY,   I.,  *Zoologie.*
LONGCHAMON,   *Minéralogie théorique et appliquée.*
LOCQUIN,   I., *Chimie générale.*
ROMAN,  I., *Géologie.*
DÉJARDIN,  *Physique.*

Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. DOUIN,  *Botanique.*
LEMARCHANDS,  I., *Chimie industrielle.*
EYRAUD,  *Mathématiques.*

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. SOLLAUD,  I., *Zoologie.*
AUMÉRAS, *Chimie physique.*
FROMAGEOT, *Chimie biologique.*
BONNET,  I., *Zoologie appliquée et Zootechnie.*
MAYET,   I., *Anthropologie.*
PELOSSE,  I., *Sériciculture.*
DONCIEUX,  I., *P. C. N., supérieur.*
SEYEWETZ,   I., *Matières colorantes artificielles.*
M^{lle} BACHRACH,  *Physiologie.*
MM. DARESTE DE LA CHAVANNE,  I., *Géologie;*
DUFAY, *Astrophysique.*

Secrétaire

M^{me} NÉTIEN, .

A LA MÉMOIRE
DU POMOLOGUE TRUELLE

A MES MAÎTRES

Avant d'exposer le résultat de nos recherches, il nous est agréable d'adresser nos plus vifs remerciements à M. le Professeur Cardot, qui a bien voulu accepter le sujet de cette thèse et qui nous a toujours témoigné la plus grande bienveillance.

Nous tenons à remercier également M. le Docteur Faës, directeur de la Station viticole de Lausanne (Suisse), MM. Couturier, professeur; Fromageot, maître de Conférences à la Faculté des Sciences, dans les laboratoires desquels nous avons effectué la plus grande partie de nos recherches et qui nous ont toujours réservé le meilleur accueil; M. le Professeur Beauverie, de la Faculté des Sciences; M. Warcollier, directeur de la Station pomologique de Caen, qui nous ont aidé de leurs conseils.

Notre reconnaissance ira tout particulièrement à M. le Professeur Guilliermond, de la Sorbonne, et à M. le Docteur Castan de la Station viticole de Lausanne, qui ont bien voulu nous initier aux méthodes de culture des levures, nous guider dans nos recherches, contrôler les résultats obtenus.

Nous avons largement profité de leur compétence et de leur érudition, qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

CONTRIBUTION à l'ÉTUDE
MORPHOLOGIQUE et PHYSIOLOGIQUE des LEVURES de POIRES

Introduction

— —

La Normandie est universellement connue pour ses vergers de pommiers et la production de son cidre.

Cependant les vergers normands ne sont pas constitués uniquement de pommiers. A côté d'eux, il existe en quantité variable, suivant les régions, un certain nombre de poiriers, produisant des fruits généralement très acides et dont l'utilisation a été longtemps la fabrication d'une eau-de-vie qui, mélangée à celle obtenue à partir des pommes, est connue sous le nom d'eau-de-vie de cidre. Lorsque ces poires ne sont pas trop acides elles produisent un poiré qui est utilisé comme boisson dans quelques contrées, notamment dans l'arrondissement de Domfront.

Les poirés mousseux ont des qualités qui les rapprochent des vins blancs d'Anjou et de Touraine.

Les poiriers que l'on rencontre dans les vergers normands sont souvent très âgés, on en plante de moins en moins; ces arbres ne donnent des fruits qu'au bout d'un temps très long, mais leur longévité est plus grande que celle des pommiers. Chevallier (11) signale l'existence dans la région de Domfront de poiriers paraissant âgés de trois siècles, certains mesurent jusqu'à 20 mètres de haut et peuvent donner jusqu'à 25 hectolitres de poires.

La suppression de l'ancien privilège des bouilleurs de cru a sensiblement diminué dans les fermes la fabrication de l'eau-de-vie de cidre et de poiré, mais depuis la

guerre une industrie nouvelle s'est créée, qui constitue un débouché important pour l'utilisation des pommes et des poires, cette industrie est celle de l'alcool neutre.

Les pommes et les poires furent d'abord traitées en mélange avec des betteraves puis seules. Les résultats obtenus furent des plus encourageants. Les perfectionnements de l'outillage permirent par la suite d'obtenir de l'alcool d'excellente qualité.

La loi du 30 juin 1916, qui a exclu les alcools d'industrie de la consommation de bouche, a assuré un développement rapide à cette nouvelle industrie.

Alors que la production d'eau-de-vie de cidre, provenant de la distillation des cidres et poirés ne dépassait pas 100.000 Hl en 1914, la production d'eau-de-vie et d'alcool provenant des pommes et des poires passait à 185.000 Hl en 1920, à 328.000 Hl en 1923 et à 347.700 Hl en 1927 : Warcollier (112).

Le traitement des pommes et des poires en vue de la production de l'alcool neutre, se fait dans des usines, par des procédés rappelant ceux utilisés en distillerie de betteraves.

Les moûts obtenus sont amenés à une densité voisine de 1030. Pour favoriser le développement de la levure, on leur ajoute des sels nutritifs (phosphate ou sulfate d'ammoniaque) et on porte leur température à 28-30°.

La fermentation est terminée au bout de deux ou trois jours. Le liquide fermenté est alors envoyé à la distillation-rectification. On obtient des alcools concentrés neutres, titrant 95 à 97°. Le départ de la fermentation est obtenu au moyen d'un pied de cuve actif, la cuve-mère sert ensuite à l'ensemencement des autres cuves par la méthode du coupage.

L'ensemencement des pieds de cuve doit se faire avec des levûres pures, acclimatées aux moûts, se développant rapidement de façon à gêner par la production de l'alcool, la multiplication des mauvaises levûres et celle des bactéries.

Il est facile de comprendre que ce sont les levures pures isolées de fruits analogues à ceux traités industriellement, qui ont le plus de chance de se développer dans les moûts et de s'y maintenir, autrement les levures apportées risquent de disparaître par suite de la concurrence vitale, au profit de celles préexistant dans le milieu, lorsque celui-ci n'est pas stérilisé.

Il semble donc qu'il soit préférable d'ensemencer les pieds de cuve avec des levures sélectionnées de pommes quand on travaille principalement des pommes, avec des levures de poires quand ces fruits constituent la matière première la plus abondante.

Le mélange des deux sortes de levures pourrait également donner des résultats intéressants.

Les levures de pommes ont été étudiées par Kayser en 1890 (41).

Les levures des poires à poiré sont moins bien connues.

Le pomologue Truelle qui a passé les dernières années de sa vie à réhabiliter la culture du poirier à poiré en France, écrivait dans le *Petit Journal Agricole* du 15 février 1925 : « Les levures de poiré n'ont pas été étudiées que je sache comme celles de cidre, sauf celle que M. Kayser a isolée d'un excellent poiré primé à l'exposition universelle de 1888 à Paris.

Les savants suisses : Muller-Thurgau et Osterwalder ont isolé sept levures de poiré... »

Les recherches les plus importantes sur les levures des poires à poiré ont été faites par Osterwalder, directeur de la station de recherches de Wädenswil en Suisse. Elles ont été publiées en 1903-1906-1924 et ont été faites sur des levures isolées de poirés destinés à la consommation.

Ces dernières années Kayser, en collaboration avec Ray et Delaval, a étudié l'action des levures sélectionnées sur la fermentation des poirés destinés également à la consommation, mais ces auteurs ne donnent qu'une description tout à fait sommaire des levures utilisées.

Ces considérations nous ont suggéré l'idée d'étudier les levûres des poires à poiré en nous limitant à celles que l'on rencontre sur les fruits utilisés en distillerie.

A cet effet, nous avons rapporté de Normandie divers échantillons de poires, de lies et de poirés en bouteilles.

Nous en avons isolé cinquante levures pures à partir d'une cellule unique, vingt-cinq ont été conservées et ont fait l'objet de cette étude.

LES LEVURES DES POIRES A POIRÉ

Le plan adopté pour cette étude a été le suivant :

I

Origine des levures isolées;
Technique de l'isolement;
Milieux de culture.

II

ETUDE MORPHOLOGIQUE

Morphologie des cellules;
Aspect de la végétation de dépôt;
Formation des voiles et des anneaux;
Cultures en stries sur gélatine;
Cultures en stries sur gélose;
Colonies géantes;
Formation des ascospores (températures limites et optima, acido-résistance, germination des ascospores);
Températures limites de bourgeonnement.

III

ETUDE PHYSIOLOGIQUE

Température mortelle;
Température optimum de fermentation;
Maximum d'alcool produit;
Résistance à l'acidité;
Action sur les sucres.

IV

DESCRIPTION DES ESPÈCES

V

ETUDE COMPLÉMENTAIRE DE LA FERMENTATION

Coefficient d'utilisation du sucre;

Acidité produite au cours de la fermentation (acidité totale, acidité volatile, nature de l'acidité volatile);

Fermentation des moûts de poires dilués analogues à ceux utilisés dans l'industrie.

Fermentation produite par une levure unique ou l'association de deux levures;

Influence de l'aliment azoté sur la vitesse de fermentation et la production de l'alcool;

Action des sels de cuivre et de manganèse sur la fermentation.

VI

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

I. - Isolement des levures

Origine des levures isolées

Les 25 levures étudiées au cours de ce travail ont été isolées de moûts de poires, de poirés et de lies provenant du département de l'Eure.

Les milieux qui nous ont servi de point de départ pour cet isolement sont les suivants :

1° *Un moût de poires de Blanchard.* — Un petit lot de ces poires provenant de La Barre (Eure) a été broyé et pressé avec une petite presse de laboratoire. Le moût obtenu a été placé dans un flacon de un litre muni d'un tube fermentateur. On l'a recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile et abandonné à la température du laboratoire.

Les poires de Blanchard sont des poires de deuxième saison. Leur maturité a lieu en octobre, Truelle (104).

2° *Un poiré de poires de Huchet* en bouteille, de l'année 1927, âgé de 15 mois au moment du prélèvement, provenant de Broglie (Eure).

Les poires de Huchet sont des poires de deuxième saison. Maturité pour le brassage en octobre.

3° *Un moût de poires non mûres*, de variété inconnue, provenant de La Barre et ayant une acidité de 10 grammes par litre en SO^4H^2 .

4° *Un poiré de poires de Gros-Vert*, en bouteille, de l'année 1927, âgé de 15 mois, provenant de Broglie. Les poires de Gros-Vert arrivent à maturité vers fin octobre-novembre.

5° *Une lie de poiré* âgée de 3 ans, recueillie deux ans auparavant au fond d'un tonneau dont le poiré avait été envoyé à la distillation. Provenance : La Barre.

6° *Un poiré issu d'un mélange de poires* et conservé en tonneau pour la distillation.

Provenance : La Barre. Age : 15 mois.

7° *Un moût de poires de Blanchard* très bien déféqué, prélevé dans une tourie de 10 litres dont le contenu nous a servi, après stérilisation, de milieu de culture pour l'étude de nos levures. Provenance : La Barre.

8° *Un poiré en bouteille*, obtenu à l'aide d'un mélange de poires mûrissant en octobre. Il avait été fabriqué en 1927 et avait 15 mois au moment du prélèvement des levures. Provenance : Broglie.

Technique de l'isolement

Afin d'obtenir des variétés de levures différentes, ces divers échantillons ont servi à ensemercer, non pas un même milieu sucré stérile, mais quatre milieux de nature ou d'acidité différentes.

On a opéré ainsi une sélection physiologique, les levures qui se développent le plus rapidement étant celles qui s'accoutument le mieux du milieu où on les cultive.

Les milieux nutritifs utilisés ont été :

a) *Un moût de poires de Blanchard* ayant une densité de 1078 et une acidité de 7 gr. 5 en SO^4H^2 .

b) *Le moût précédent dont l'acidité a été portée à 10 grammes par litre, exprimée en SO^4H^2 , par addition d'acide malique.*

c) *Un moût de pommes de Cusset*, de densité 1049 et d'une acidité de 2 gr. 1, en SO^4H^2 .

d) *Un moût de poires à cuire*, de densité 1044 et d'une acidité de 1 gr. 3.

Nous avons préparé pour chaque échantillon destiné à

l'isolement quatre flacons contenant chacun un des quatre milieux nutritifs précédents.

Ces différents milieux avaient été répartis à raison de 80 cm³ dans des flacons de 125 cm³ et stérilisés une heure à la vapeur fluente.

Les flacons ont été inoculés à l'aide des divers échantillons contenant les levures à isoler. La quantité de milieu inoculé a été de 1 cm³ pour les moûts et de 2 cm³ pour les poirés, en raison de leur moindre richesse en levures.

Le milieu nutritif a été ensuite recouvert d'une épaisseur de un demi-centimètre d'huile de vaseline stérile, pour empêcher le développement des moisissures et des ferments acétiques; puis, après avoir muni les flacons de tubes fermentateurs on les a placés dans une étuve électrique réglée à 28°.

Quatre milieux différents ayant été utilisés pour la multiplication des microorganismes contenus dans les 8 échantillons à étudier, nous avons eu à notre disposition 32 flacons.

Le septième jour, tous ces flacons étant en pleine fermentation, nous avons pu, alors, procéder à l'isolement des levures.

CULTURES A PARTIR D'UNE CELLULE UNIQUE

L'étude d'un microorganisme ne peut avoir de valeur scientifique que si l'on a affaire à une espèce pure; or, s'il est relativement facile de débarrasser les levures des bactéries et des moisissures qui les accompagnent, la séparation des diverses espèces de levures est beaucoup plus compliquée.

Il faut arriver à isoler une seule cellule et à la multiplier aseptiquement pour être certain d'avoir une espèce pure.

Diverses méthodes ont été préconisées pour l'obtention de cultures pures.

La *méthode physiologique* employée par Pasteur et

qui consiste à favoriser le développement d'une espèce se trouvant dans un mélange de diverses espèces, en agissant sur la température, la composition du milieu, méthode que nous avons mise à profit pour opérer un premier triage des levures; elle ne présente pas de certitude pour l'obtention de cultures pures.

La *méthode des dilutions*, imaginée par le savant anglais Lister pour l'étude des ferments lactiques, donne des résultats beaucoup plus certains; aussi presque tous les procédés actuels d'isolement d'une cellule unique se rapportent-ils à cette méthode.

En 1881, Hansen (28) a décrit une méthode de dilution qui utilise des milieux liquides et donne de bons résultats avec les levures. Mais cette méthode est longue et n'est guère pratique lorsqu'on veut isoler un grand nombre de levures à l'état pur.

La seconde méthode de Hansen (30) comporte l'emploi de milieux solides à la gélatine; cette méthode, plus commode que la précédente, a été perfectionnée et elle a permis d'imaginer des procédés simples et rapides pour l'obtention de cultures pures de levures.

Parmi ces procédés citons : *la méthode des cultures en gouttes* de Lindner (65); *la méthode des cultures en gouttelettes*, du même auteur, et *la méthode par pointage* à l'encre de Chine, de Burri (9), page 95. Pour être complet nous signalerons également la méthode utilisant le micromanipulateur de Zeiss.

Pour nos isollements, nous avons utilisé la méthode de Burri; les résultats que nous avons obtenus ayant été excellents, nous la décrirons en détail.

CULTURES DE CELLULES UNIQUES PAR LA MÉTHODE DE BURRI

Un cm³ du milieu en fermentation est introduit à l'aide d'une pipette de Pasteur, dans 50 cm³ d'eau stérile. On

mélange bien par un mouvement de rotation du tube entre les mains.

Un cm^3 de cette première dilution est porté, à l'aide d'une pipette graduée stérile, dans 50 cm^3 d'eau stérile et bien mélangé.

On obtient ainsi une dilution au $1/250^{\circ}$ de la culture.

Ensuite, on fait fondre dans de l'eau chaude du moût gélatiné contenu dans des tubes à essais (15 cm^3 par tube). La fusion opérée, les tubes sont placés à l'étuve à 37° pour permettre à la gélatine de se refroidir un peu, afin de ne pas tuer les levures.

$1/2 \text{ cm}^3$ de culture diluée au $1/250^{\circ}$, prélevé à la pipette graduée, est introduit dans chaque tube de gélatine liquéfiée.

On refait la même opération pour une autre série de tubes de gélatine, mais avec $3/4$ de cm^3 de culture diluée.

Après mélange, par rotation des tubes entre les mains, on coule la gélatine en boîtes de Pétri, on répartit uniformément et, après refroidissement, les boîtes sont abandonnées à la température du laboratoire ($16-17^{\circ}$), le couvercle en dessous pour que la condensation de la vapeur d'eau ne risque pas de mélanger les colonies.

On obtient ainsi deux cultures sur gélatine par échantillon.

Au bout de onze à douze jours, les cultures sont suffisamment développées pour permettre l'isolement de cellules uniques.

Après avoir vérifié au microscope la pureté des colonies où l'on va effectuer des prélèvements, on prépare le matériel suivant nécessaire à l'isolement.

Du moût gélatiné stérile est coulé dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 3 mm . On prépare au préalable une solution de nigrosine (la nigrosine est préférable à l'encre de Chine) d'après les indications du docteur Schweizer, du Service fédéral de l'Hygiène à

Berne. L'obtention de cette solution se fait de la façon suivante :

« On abandonne 5 grs de nigrosine B avec 100 cm³ d'eau contenant 2 gouttes de chloroforme comme antiseptique.

On agite et on mélange très fréquemment.

La solution ne devient pas complète et on travaille avec un excès de colorant.

Après quelques jours, on filtre environ dix fois à travers du papier à filtrer épais et l'on conserve la solution colloïdale ainsi obtenue dans des flacons bien bouchés. »

La nigrosine à l'eau vendue en France ne convient pas.

Nous avons utilisé avec succès de la nigrosine M. P. que nous avons fait venir de Genève.

Trois gouttes de cette nigrosine prélevées avec une pipette stérile sont déposées sur une lame porte-objet préalablement flambée.

A l'aide d'un fil de platine on prélève dans une boîte de Pétri un très petit fragment de colonie isolée.

On le dilue dans la première goutte de nigrosine, puis dans la deuxième, puis dans la troisième, sans recharger le fil de platine.

Avec une plume fine, préalablement flambée, on prélève de l'encre dans la deuxième goutte, puis on fait toute une série de points sur une des plaques de gélatine stérile.

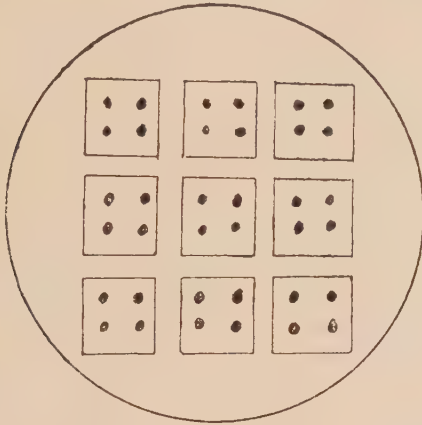
Ces points sont disposés par quatre de façon à pouvoir être recouverts par des lamelles couvre-objets.

En général, la moitié des points sont faits avec la deuxième dilution, l'autre moitié avec la troisième.

Il est nécessaire que la plume ne pénètre pas dans la gélatine; pour cela, la tenir aussi horizontalement que possible et employer des boîtes de Pétri de faible hauteur.

Les boîtes ayant 95 mm. de diamètre et 10 mm. de hauteur conviennent très bien.

Après avoir recouvert les points de lamelles flambées, on procède à l'examen microscopique des taches afin de repérer celles ne contenant qu'une seule cellule.



Il est nécessaire pour réussir cet examen d'avoir une gélatine bien transparente et d'utiliser un oculaire fort et un objectif à long foyer pour ne pas écraser la préparation (avoir un grossissement d'environ 500 diamètres).

Les taches ne contenant qu'une seule cellule sont marquées au crayon rouge, en dessous des boîtes.

L'examen microscopique terminé, les boîtes sont recouvertes de leur couvercle et abandonnées à la température du laboratoire, en ayant soin de les disposer le couvercle en dessous.

De nouveaux examens microscopiques sont faits les deuxième et troisième jours, afin de contrôler l'exactitude du premier. Lorsqu'il y a plus d'une cellule dans la tache, ce sont plusieurs colonies qui apparaissent.

En général, au bout du troisième jour, les colonies issues d'une cellule unique sont suffisamment développées pour être repiquées en milieu liquide.

Pour pratiquer ce repiquage, les lamelles couvre-ob-

jets recouvrant la gélatine sont soulevées avec une pince et les colonies repérées sont enlevées avec une particule de gélatine, au moyen d'un fil de platine aplati à son extrémité; ces colonies sont ensuite introduites dans des flacons contenant du moût stérile et bouchés au coton (flacons de 125 cm³ avec 50 cm³ de moût de poires de Blanchard).

Après avoir recouvert la surface libre du moût avec un peu d'huile de vaseline stérile, on munit les flacons de tubes fermentateurs et on les abandonne à la température du laboratoire.

On repique à peu près une cellule par boîte de Pétri, quelquefois deux, quand la deuxième boîte est moins bonne que la première au point de vue dilution.

Les dilutions faites au 1/250^e ont, en général, été très satisfaisantes.

Nous avons ainsi isolé 50 levures pures par la méthode de Burri.

Les derniers flacons ensemencés ont été placés dans une étuve électrique réglée à 25°, afin que les fermentations fussent, autant que possible, aussi avancées dans chacun des flacons.

Tous les flacons ont été finalement placés à l'étuve électrique durant 48 heures, puis on s'en est servi pour ensemer 50 flacons de moût de poires qui ont été placés à l'étuve à 28°.

Nous avons observé le départ de la fermentation.

5 flacons ont fermenté au bout de 29 heures

6	—	—	—	31	—
8	—	—	—	36	—
6	—	—	—	47	—
1	—	—	—	49	—
2	—	—	—	72	—
2	—	—	—	92	—

Le septième jour, tous les flacons ont été sortis de l'étuve; ceux qui n'avaient pas fermenté, au nombre de vingt, ont été éliminés. La plupart ont donné des voiles,

par la suite, ils renfermaient des levures mycodermiques n'ayant pas d'intérêt au point de vue pratique.

Dans les trente flacons conservés nous avons dosé le sucre restant (le flacon témoin contenait 148 grs de sucre interverti).

La quantité de sucre restant a varié de 45 à 82 grs, sauf pour quatre levures où elle dépassait 100 grs, celles-ci ont été éliminées comme donnant une fermentation insuffisante.

Une autre levure a été éliminée par la suite, comme n'étant pas pure.

Il nous est resté 25 levures que nous avons numérotées de 1 à 25. Leur provenance est la suivante :

levure			1 ^{er} ensem.		
1	Moût de poires	Blanchard	—	sur moût de p.	Blanchard
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	sur moût de poires	acidifié
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	sur moût de pommes	—
6	Poiré de Gros Vert	—	—	sur moût de p.	Blanchard
7	—	—	—	sur moût de poires	acidifié
8	—	—	—	sur moût de pommes	—
9	—	—	—	sur moût de poires à cuire	—
10	Moût de poires non mûres	—	—	sur moût de p.	Blanchard
11	Poiré de poires de Huchet	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—
13	—	—	—	sur moût de poires	acidifié
14	—	—	—	sur moût de poires	acidifié
15	—	—	—	sur moût de pommes	—
16	—	—	—	sur moût de poires à cuire	—
17	Vieilles lies de poiré	—	—	s. moût de p. Blan.	acidifié
18	Poiré (mélange de poires)	—	—	sur moût de pommes	—
19	Moût de p. Blan. déféqué	—	—	—	—
20	—	—	—	sur moût de poires à cuire	—
21	Poiré en bout. (mél. de p.)	—	—	—	—
22	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—

Milieux de culture

Les levures que nous avons isolées ont été cultivées dans les milieux suivants :

Moût de poires stérile. — Nous nous sommes servi principalement de moût de poires de Blanchard, pour les raisons suivantes : ces poires mûrissent de bonne heure (mi-octobre); elles donnent un moût riche en sucre (140 à 145 gr. par litre), ayant une forte acidité (6 à 8 grs en SO^4H^2 par litre) et se clarifiant bien, après stérilisation par la chaleur.

Préparation. — Une fois le moût obtenu, le stériliser durant une heure à la vapeur fluente, décanner, répartir en flacons et stériliser à nouveau une heure à 100° .

Moût de pommes stérile. — Il se prépare de la même façon que le moût de poires.

Eau de levure. — Délayer 100 gr. de levure de boulangerie dans un litre d'eau ordinaire, chauffer au bain-marie à $50-60^\circ$ durant une heure; puis maintenir durant 20 minutes à 120° à l'autoclave.

Décanner ensuite la partie claire, la filtrer sur un grand filtre à plis en papier, puis stériliser à nouveau à 115° , durant un quart d'heure, et laisser reposer.

Le milieu ainsi obtenu a une très faible acidité (0 gr. 2 exprimé en SO^4H^2 et un pH de 6,2).

Il faut l'additionner d'acide malique (2 à 5 0/00) et de sucre pour avoir un liquide favorable à la culture des levures.

L'addition d'acide malique produit un louche peu appréciable, le milieu s'éclaircit rapidement en donnant un léger dépôt.

Répartir dans les récipients définitifs et finalement stériliser un quart d'heure à 110° .

Milieux gélatinés. — Introduire 150 grs de gélatine blanche dans 900 cm^3 d'eau, laisser gonfler durant 12 heures.

Opérer ensuite la fusion au bain-marie maintenu à 70°.

Une fois la gélatine fondue, l'additionner de 70 cm³ de moût de densité 1075 (au cas où la densité serait plus faible, il y aurait lieu d'augmenter la quantité de moût, pour avoir à peu près la même quantité de sucre); puis coller avec un blanc d'œuf délayé dans un peu d'eau.

Après avoir bien remué, introduire le tout dans un ballon bouché au coton et stériliser dix minutes à 110°.

Lorsque l'autoclave est refroidi sortir le ballon. Filtrer la gélatine encore liquide sur papier, dans un entonnoir à filtration chaude. La répartir ensuite dans des tubes à essais ou des Erlenmeyer, stériliser à 105-107°.

Il ne faut pas dépasser cette température, car on coagulerait à nouveau des protéines.

En opérant de la sorte on obtient un milieu très transparent, convenant bien pour les isollements par la méthode de Burri et la photographie des colonies géantes. En outre les levures poussent très bien sur ce milieu.

La quantité de moût employée étant très petite il ne se produit pas d'hydrolyse de la gélatine durant le chauffage, bien que le milieu soit acide.

Moût gélosé. — Diluer le moût avec 6 fois son volume d'eau, le neutraliser avec de la soude N/4, en présence de papier de tournesol.

L'introduire dans un ballon, puis l'additionner à raison de 18 grs par litre, d'agar découpé en petits morceaux.

Stériliser un quart d'heure à 110°. Sortir le ballon lorsque l'autoclave est refroidi. Filtrer aussitôt sur toile dans un entonnoir à filtration chaude puis répartir dans les récipients définitifs et stériliser de nouveau à 107°, durant un quart d'heure.

Les milieux à base de gélose sont troubles et laissent exsuder de l'eau assez longtemps; on ne peut les utiliser immédiatement.

Nous avons surtout utilisé les tubes de gélose inclinée pour la conservation de nos levures, les infections étant beaucoup moins à craindre qu'avec les milieux liquides.

Nous avons cultivé nos levures principalement sur des moûts de poires de façon à ne pas modifier leurs caractères.

Ces moûts ont l'inconvénient de ne pas être des milieux définis, ils sont impossibles à reproduire, leur composition variant d'une année à l'autre et avec la façon dont on a opéré le brassage.

Lutz et Guegen (69) ont recommandé l'unification des méthodes de culture pour la détermination des mucé-dinées et des levures et préconisé l'utilisation de milieux minéraux bien définis, ces milieux ayant le grand avantage de rendre comparables les résultats des cultures.

Nous n'avons utilisé les milieux minéraux que pour l'étude du rôle de l'azote, dans la fermentation et pour celle des catalyseurs.

Par contre, au cours de cette étude, nous donnerons assez souvent, à côté des résultats obtenus avec des cultures sur moût, ceux trouvés sur eau de levure sucrée.

Ce milieu recommandé par Osterwalder est constitué par l'eau de levure préparée suivant le mode opératoire indiqué précédemment, et additionné de 2 0/00 d'acide malique, et 30 0/00 de glucose.

Si ce milieu n'est pas, à proprement parler, un milieu défini, il a cependant l'avantage d'être facile à reproduire; de plus, les levures de poires que nous avons isolées y poussent très bien. Son pH est de 5,1.

II. - Etude morphologique

Morphologie des cellules

D'après Kayser (37), p. 70, la forme des cellules de levure dépend :

1° *De la nature de la levure.*

2° *De l'âge.*

Les cellules vieilles ont le protoplasma granuleux, ne remplissant pas l'enveloppe qui, de ce fait, paraît double. A mesure que le globule vieillit, on voit apparaître une ou deux vacuoles.

3° *De la température.*

Une température élevée agit comme l'âge; les globules ayant subi une température élevée ont l'aspect souffreteux.

4° *De l'acidité.*

Celle-ci fait allonger les levures. Les levures habituées aux milieux acides sont les moins gênées.

5° *De la richesse saccharine.*

Une richesse en sucre trop forte donne un aspect souffreteux. Une richesse normale fait gonfler les globules.

6° *De la quantité d'oxygène.*

Après absorption d'oxygène les cellules deviennent ovales, globuleuses à articles courts.

Les dimensions suivent de près la variation des formes. Il est donc essentiel dans l'étude morphologique de bien définir les conditions de culture.

Pour Hansen (33) il est essentiel de prendre un même

et bon bouillon de culture (bouillon de touraillon très limpide et peu foncé sucré à 5 0/0 environ (moût de raisin parfaitement clair, peu sucré, d'une acidité faible et constante). Il faut, en outre, opérer à une température optima de 25-27° et observer les cultures au même âge (48 heures après ensemencement). Cité par Bottu (7), p. 21.

Les cultures destinées à l'examen morphologique des cellules ont été faites dans des tubes à essais de 160×16 mm. contenant 10 cm³ de moût dilué, très limpide, renfermant 54 grs de sucre par litre et ayant une acidité de 3 grs 1, exprimée en SO⁴H² par litre.

Ces tubes ont étéensemencés à la pipette avec 1/4 de cm³ de culture âgée de 17 jours. Ils ont été placés à l'étuve électrique réglée à 25°. L'examen microscopique a eu lieu le troisième jour. Les cellules ont été dessinées à la chambre claire (voir planches I à III). La forme des levures n'est pas un caractère spécifique dans la plupart des cas; cependant, il y a dans les levures des formes dominantes : type *pastorianus*, type *cerevisiae*, type ellipsoïdeus, type *torula*. Il y a d'ailleurs des cas où les levures ont une forme spécifique: (*Saccharomycodes*, *Schyzosaccharomyces*, *Sporobolomyces*). L'étude morphologique des cellules de levures nous a permis de ranger la levure 13 parmi les levures apiculées.

La levure 22 se distingue nettement des autres par la petitesse des dimensions de ses cellules : 6×4 μ en moyenne.

Les levures 4, 8, 15 ont des cellules de formes et de dimensions bien homogènes.

Les levures 2, 6, 7, 11, 20, 23, 24 renferment des cellules du type pastorien.

Les dimensions moyennes chez l'ensemble de nos levures sont 8 μ pour la longueur et 6 μ pour la largeur.

Caractères de la végétation de dépôt

Les cultures ayant servi à l'examen de la morphologie des cellules ont été abandonnées à la température du laboratoire et le dépôt formé au fond des tubes a été examiné au bout de 40 jours, c'est-à-dire, une fois la fermentation terminée.

Toutes nos levures ont donné après fermentation un liquide clair, le moût employé était lui-même très clair.

Dans les conditions où l'on a opéré, il n'y a pas eu formation, à la partie supérieure du liquide, de voile, ni même d'anneau.

En général, on a observé un dépôt blanc adhérent au fond du tube, ne se décollant pas entièrement par rotation de celui-ci entre les mains.

Ce dépôt était à grain fin, ainsi qu'on a pu s'en rendre compte en le mettant en suspension dans le liquide, par rotation du tube entre les mains.

On a trouvé ces caractères chez les levures 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 19, 23, 25.

La levure 13 présentait un dépôt jaunâtre moins abondant et moins adhérent que celui des levures précédentes.

La levure 6 un dépôt blanc rassemblé au fond, un peu grumeleux.

Les levures 15 et 16 un dépôt blanc-jaunâtre, un peu grumeleux.

La levure 17 un dépôt blanc-jaunâtre, peu abondant, peu adhérent, au fond du tube, un peu grumeleux.

La levure 20, un dépôt légèrement brunâtre, peu adhérent, à grain fin.

Les levures 21 et 22 un dépôt brunâtre, peu abondant, peu adhérent.

Les levures à dépôt grumeleux sont intéressantes pour la fabrication des poirés mousseux « où il faut obtenir un dépôt sec granuleux, glissant bien sur le verre et non pas un dépôt adhérent. » (Kayser).

MORPHOLOGIE DES CELLULES DE LA VÉGÉTATION DE DÉPÔT

(Planches IV à VI)

L'examen a eu lieu au bout de 40 jours.

Osterwalder (84) distingue deux groupes de levures au point de vue de la forme des cellules de dépôt :

1° *Des levures donnant uniquement des cellules elliptiques* et se comportant, au point de vue de la forme des cellules, comme *Saccharomyces ellipsoïdeus* I et II de Hansen.

2° *Des levures formant, à côté de cellules elliptiques, de longues cellules claviformes, dites pastoriennes* et qui, à ce point de vue, se comportent comme les *Saccharomyces Pastorianus* (*Saccharomyces Pastorianus* I Hansen, *Saccharomyces Pastorianus* II Hansen, *Saccharomyces Pastorianus* III Hansen).

La plupart des levures de vins de fruits (cidre, poiré) qu'a étudié ce savant se comporteraient au point de vue morphologique, comme *Saccharomyces Pastorianus* Hansen et la plupart des levures de vin de raisin, comme *Saccharomyces ellipsoïdeus* Hansen.

Les cellules pastoriennes existent dans la végétation de dépôt de la plupart de nos levures de poiré; cependant, elles font défaut chez les levures 8, 9, 10, 13, 17, 21, soit chez six levures sur vingt-cinq.

La levure 21 se distingue par la petitesse de ses cellules ($5 \times 3 \mu$ en moyenne).

Les levures 9, 22 par des cellules plus petites que les autres levures (Lev. 9: $5 \times 4 \mu$; lev. 22: $6 \times 5 \mu$).

Nous avons trouvé des cellules sporulées chez les levures 1, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 18, 20, 23, 25.

La sporulation était surtout abondante chez la levure 25.

Les levures 6, 9, 10, 12 ont des cellules de forme et de dimensions bien homogènes.

Formation des voiles et des anneaux

Les températures limites et optima de formation des voiles, le temps nécessaire à leur formation constituent des caractères importants pour la détermination des levures.

Osterwalder ayant constaté que les levures de poires qu'il avait étudiées ne donnaient pas de voiles (84), ou ne donnaient que des îlots de voiles (85), il était à présumer que les nôtres n'en donneraient pas.

L'immobilité du liquide et l'accès libre de l'air à la surface, étant les conditions essentielles du phénomène Kayser (37), p. 78, nous avons adopté la technique d'Osterwalder qui semblait le mieux tenir compte de ces conditions.

Des flacons d'Erlenmeyer de 250 cm³ contenant 100 cm³ de moût de poires, ont étéensemencés à la boucle de platine, avec nos vingt-cinq levures.

La culture était âgée de huit jours.

Chaque flacon, après ensemencement, a été simplement coiffé d'un cornet formé d'un double de papier filtre, stérilisé et placé à l'étuve électrique réglée à 25°.

Les observations ont été faites au bout de 12 jours, 21 jours, 34 et 43 jours.

Nous n'avons pas observé de voile continu, mais seulement des îlots de voile chez les levures 3, 4, 19, 20. Ces îlots formaient une tache au centre de la surface du liquide.

Nous avons pu observer un anneau net chez les levures 1, 2, 13, 16, 17, 21, 22.

Il était interrompu, fragmenté ou peu perceptible chez les levures 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 19, 20, 23, 24, 25.

Il n'y avait pas formation d'anneau chez les levures 7, 10, 18.

Nous avons refait le même essai à la température de 16° avec les levures ayant donné des îlots de voile. Les cellules formant ces îlots ont été examinées au bout de 40 jours.

MORPHOLOGIE DES CELLULES DES ÎLOTS DE VOILE

à 16° au bout de quarante jours - Voir planche VII

Les îlots de voile étaient constitués par des cellules de grandes dimensions, quelques-unes atteignant 20-25 μ . Les cellules pastoriennes étaient abondantes. Nous avons observé des cellules sporulées dans les îlots des levures 3, 4, 20; il n'y en avait pas dans ceux de la levure 19.

Cultures en stries sur moût gélatiné à surface inclinée

D'après Steiner (100) « l'aspect des colonies obtenues
« par culture en strie sur gélatine inclinée, peut sensi-
« blement varier sous l'influence de divers facteurs ex-
« térieurs, tels que la proportion de gélatine, la compo-
« sition du moût, le diamètre du tube, la couleur et
« l'épaisseur du verre, la stérilisation du milieu, l'ensemencement, la quantité de milieu à la disposition de la
« levure, etc... »

Il semblerait donc que les caractères fournis par ces cultures n'aient rien de spécifique. Cependant les formes observées dans les mêmes conditions de culture, sont assez constantes pour qu'on puisse en tirer des caractères distinctifs intéressants. C'est ainsi que Hansen a montré que le *S. intermedius* et le *S. validus* cultivés en strie sur eau de levure gélatinée, se distinguaient nettement l'un de l'autre, le premier donnant une strie à bords unis, le second à bords velus.

Osterwalder a également trouvé des différences suf-

fisamment nettes, entre les cultures en stries des différentes levures de poiré qu'il a étudiées.

Mode opératoire. — Nous avons utilisé des tubes de 160×16 mm. contenant 8 cm³ de moût de poire gélatiné.

Après fusion de la gélatine, les tubes ont été inclinés etensemencés le lendemain avec une culture âgée de 2 mois.

L'ensemencement a été fait avec une boucle de platine en traçant une strie droite, sans léser la gélatine. Les tubes ont été abandonnés dans un tiroir à la température du laboratoire 17-18°.

Aspect macroscopique. — L'examen en a été fait au bout de 17 jours. Les cultures ont été conservées jusqu'à ce qu'elles aient été liquéfiées par les fortes chaleurs de juillet (au bout de 105 jours).

La rapidité de liquéfaction de la gélatine a été très variable suivant les levures (voir tableau I).

Alors que la levure 17 avait liquéfié la gélatine en 18 jours, les levures 4, 8, 19, 21, 22 ne l'avaient pas liquéfiée en 105 jours.

Pour les autres levures, la liquéfaction a eu lieu entre le 27^e et le 53^e jour, sauf pour la levure 13 où elle a eu lieu le 82^e jour.

Chez les levures 1, 3, 8, 9, 13, 15, 18, 19 le bord de la strie est à peu près lisse; chez les autres, il est plus ou moins sinueux ou crénelé.

Les cultures en stries des levures 6, 11, 13, 21, 22 se différencient nettement de celles des autres levures.

La strie de la levure 6 a une surface mamelonnée; celle de la levure 11 est formée de colonies rondes confluentes; chez la levure 13, la culture est mince, légèrement transparente, peu surélevée. La strie chez la levure 22 est plissée transversalement, les bords sont mamelonnés; elle est formée d'îlots confluent.

La strie de la levure 21 ressemble à celle de la levure 22.

Nous avons refait le même essai à la température de 16° avec les levures ayant donné des îlots de voile. Les cellules formant ces îlots ont été examinées au bout de 40 jours.

MORPHOLOGIE DES CELLULES DES ÎLOTS DE VOILE

à 16° au bout de quarante jours - Voir planche VII

Les îlots de voile étaient constitués par des cellules de grandes dimensions, quelques-unes atteignant 20-25 μ . Les cellules pastoriennes étaient abondantes. Nous avons observé des cellules sporulées dans les îlots des levures 3, 4, 20; il n'y en avait pas dans ceux de la levure 19.

Cultures en stries sur moût gélatiné à surface inclinée

D'après Steiner (100) « l'aspect des colonies obtenues
« par culture en strie sur gélatine inclinée, peut sensi-
« blement varier sous l'influence de divers facteurs ex-
« térieurs, tels que la proportion de gélatine, la compo-
« sition du moût, le diamètre du tube, la couleur et
« l'épaisseur du verre, la stérilisation du milieu, l'ensemencement, la quantité de milieu à la disposition de la
« levure, etc... »

Il semblerait donc que les caractères fournis par ces cultures n'aient rien de spécifique. Cependant les formes observées dans les mêmes conditions de culture, sont assez constantes pour qu'on puisse en tirer des caractères distinctifs intéressants. C'est ainsi que Hansen a montré que le *S. intermedius* et le *S. validus* cultivés en strie sur eau de levure gélatinée, se distinguaient nettement l'un de l'autre, le premier donnant une strie à bords unis, le second à bords velus.

Osterwalder a également trouvé des différences suf-

faisamment nettes, entre les cultures en stries des différentes levures de poiré qu'il a étudiées.

Mode opératoire. — Nous avons utilisé des tubes de 160×16 mm. contenant 8 cm^3 de moût de poire gélatiné.

Après fusion de la gélatine, les tubes ont été inclinés et ensemencés le lendemain avec une culture âgée de 2 mois.

L'ensemencement a été fait avec une boucle de platine en traçant une strie droite, sans léser la gélatine. Les tubes ont été abandonnés dans un tiroir à la température du laboratoire $17-18^\circ$.

Aspect macroscopique. — L'examen en a été fait au bout de 17 jours. Les cultures ont été conservées jusqu'à ce qu'elles aient été liquéfiées par les fortes chaleurs de juillet (au bout de 105 jours).

La rapidité de liquéfaction de la gélatine a été très variable suivant les levures (voir tableau I).

Alors que la levure 17 avait liquéfié la gélatine en 18 jours, les levures 4, 8, 19, 21, 22 ne l'avaient pas liquéfiée en 105 jours.

Pour les autres levures, la liquéfaction a eu lieu entre le 27° et le 53° jour, sauf pour la levure 13 où elle a eu lieu le 82° jour.

Chez les levures 1, 3, 8, 9, 13, 15, 18, 19 le bord de la strie est à peu près lisse; chez les autres, il est plus ou moins sinueux ou crénelé.

Les cultures en stries des levures 6, 11, 13, 21, 22 se différencient nettement de celles des autres levures.

La strie de la levure 6 a une surface mamelonnée; celle de la levure 11 est formée de colonies rondes confluentes; chez la levure 13, la culture est mince, légèrement transparente, peu surélevée. La strie chez la levure 22 est plissée transversalement, les bords sont mamelonnés; elle est formée d'îlots confluent.

La strie de la levure 21 ressemble à celle de la levure 22.

TABLEAU I

Liquéfaction de la gélatine (cultures en stries)

LEVURES	TEMPS AU BOUT DUQUEL LA LIQUÉFACTION S'EST PRODUITE	LEVURES	TEMPS AU BOUT DUQUEL LA LIQUÉFACTION S'EST PRODUITE
1	41 j.	14	27 j.
2	38 j.	15	53 j.
3	38 j.	16	53 j.
4	Pas au bout de 105 j.	17	18 j.
5	53 j.	18	42 j.
6	41 j.	19	Pas au bout de 105 j.
7	41 j.	20	49 j.
8	Pas au bout de 105 j.	21	Pas au bout de 105 j.
9	d°	22	d°
10	53 j.	23	53 j.
11	49 j.	24	41 j.
12	42 j.	25	35 j.
13	82 j.		

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES CULTURES EN STRIES

Il a été fait sans coloration des cellules au bout de 28 jours.

Les levures 3, 4, 6, 7, 14, 23, 24, 25 renfermaient des cellules pastoriennes.

A l'exception de la levure 13 (apiculée), des levures 19, 21, 22, toutes nos levures présentaient des cellules sporulées; ces cellules étaient parfois très nombreuses. Nos levures de poirés sporulent donc facilement sur gélatine au moult.

L'examen microscopique des cultures en stries nous a permis d'observer des phénomènes de copulation chez la levure 17 qui a pu être identifiée immédiatement comme appartenant au genre *Zygosaccharomyces*.

CULTURES EN STRIES SUR MOÛT GÉLOSÉ
A SURFACE INCLINÉE

Ces cultures ressemblaient beaucoup aux cultures en stries sur gélatine.

Elles ont servi à l'étude de la sporulation et à celle de la germination des ascospores.

Colonies géantes

La méthode des colonies géantes préconisée par Lindner en 1893 (64) consiste à déposer une goutte de dilution de levure en un point de la surface d'une couche de gélatine nutritive contenue dans un récipient approprié.

Il se forme une colonie, souvent très caractéristique par son aspect et pouvant atteindre plusieurs centimètres de diamètre.

La gélatine doit avoir une grande surface au contact de l'air et présenter une épaisseur convenable.

Nous avons utilisé pour obtenir ces colonies des Erlenmeyer de 250 cm³ bouchés au coton, contenant du moût gélatiné sur une épaisseur de 2 centimètres.

L'inoculation a été faite en déposant avec une pipette effilée une goutte de culture âgée de deux mois au centre de la surface de la gélatine.

Les récipients ont été abandonnés à la température du laboratoire (17-18°).

L'examen macroscopique de ces colonies a été fait au bout de 40 jours. Celles-ci étaient alors très bien développées, leur diamètre variait de 10 à 19 mm.

On aurait pu attendre quelques semaines de plus pour avoir des colonies de dimensions beaucoup plus grandes, mais ç'eut été courir le risque de voir la gélatine se liquéfier.

Il est à remarquer qu'il n'y a pas toujours concordance entre le temps de liquéfaction de la gélatine par la culture en strie et la liquéfaction par la colonie géante, obtenues à partir d'une même levure, ainsi que le montre le tableau II.

TABLEAU II

<i>Temps au bout duquel s'est produit la liquéfaction de la gélatine</i>		
LEVURES	CULTURE EN STRIE	COLONIE GÉANTE
1	41 jours	Pas au bout de 105 j.
2	38 jours	53 jours
3	38 jours	45 jours
5	Pas au bout de 105 j.	Pas au bout de 105 j.
4	53 jours	48 jours
6	41 jours	45 jours
7	41 jours	55 jours
8	Pas au bout de 105 j.	70 jours
9	d°	94 jours
10	53 jours	45 jours
11	49 jours	45 jours
12	42 jours	70 jours
13	82 jours	35 jours
14	27 jours	45 jours
15	53 jours	70 jours
16	53 jours	94 jours
17	18 jours	Pas au bout de 105 j.
18	42 jours	94 jours
19	Pas au bout de 105 j.	Pas au bout de 105 j.
20	49 jours	45 jours
21	Pas au bout de 105 j.	48 jours
22	d°	48 jours
23	53 jours	48 jours
24	41 jours	48 jours
25	35 jours	45 jours

C'est ainsi que la levure 17 (*Zygosaccharomyces*) sous forme de culture en strie, liquéfie la gélatine au bout de 18 jours, alors qu'elle ne la liquéfie pas au bout de 105 jours sous forme de colonie géante.

La levure 13 (apiculée) qui liquéfie rapidement la gélatine (35 jours) à l'état de colonie géante, ne la liquéfie qu'en 82 jours sous forme de culture en strie. Les mêmes

remarques pourraient être faites pour les levures 1, 21, 22.

Considérées au point de vue aspect, toutes les colonies géantes des levures de poiré sont blanches; celle de la levure 17 est d'un blanc cireux.

Les colonies des levures 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 23, 25 forment un groupe se distinguant par de nombreuses stries radiaires, partant du cratère et donnant à la surface un aspect finement plissé. Quelquefois des plis plus profonds partagent la surface en lobes plus ou moins nets, comme chez les levures 7, 12, 14.

Les colonies des levures 1, 4, 18, 19, 20, 24 forment un deuxième groupe caractérisé par des plis circulaires recoupés par des plis radiaires.

Celles des levures 21 et 22 forment un troisième groupe caractérisé par un cratère peu accentué, une surface presque lisse.

Enfin les colonies des levures 13 (apiculée) et 17 (*Zygosaccharomyces*) se distinguent nettement des autres, la première par l'absence de cratère et une surface moutonnée, la deuxième par son aspect blanc cireux, ses stries circulaires très fines, son cratère large et peu profond.

Les photographies des colonies géantes qui illustrent ce travail ont été obtenues à l'aide de cultures sur boîtes de Pétri et sur Erlenmeyer. Il est préférable d'utiliser des Erlenmeyer et de les scier ensuite, les boîtes de Pétri présentant trop de risques d'infection par les moisissures.

Formation des ascospores (Voir planches VIII à XI)

Hansen (29) a montré que les conditions de formation des ascospores sont un des caractères les plus intéressants pour la détermination des levures.

Ce sont les températures limites qui sont les plus importantes à considérer pour la caractérisation des espèces.

Nous avons vu précédemment que les levures de poires, que nous avons isolées, sporulaient facilement sur moût gélatiné et sur moût gélifié ; que l'on trouvait des cellules sporulées dans la végétation des îlots de voile, chez les levures 3, 4, 20 ; dans la végétation de dépôt des levures 1, 5, 8, 10, 11, 12, 16, 18, 20, 23, 25.

Nous avons étudié les températures limites et optima de formation des ascospores sur bloc de plâtre humide.

Quelques levures n'ayant pas sporulé sur plâtre, nous avons pu les faire sporuler sur carotte.

Quant à la levure apiculée sa sporulation a été étudiée au moyen de la technique donnée récemment par Kufferath.

Les conditions nécessaires à la sporulation sont les suivantes : cellules jeunes et vigoureuses, manque de nourriture, libre accès de l'air, température et humidité favorables.

Technique. — Du moût de poires de Blanchard, amené avec de l'eau à la densité de 1.050, est réparti à raison de 50 cm³ dans des flacons de 125 cm³ bouchés au coton, puis stérilisé une heure à la vapeur fluente. Les flacons sont ensuiteensemencés à la pipette avec dix gouttes d'une culture âgée de 8 jours. Au bout de cinq jours, la moitié du liquide est décantée et remplacée par du moût neuf. Deux jours après on décante à nouveau les deux tiers du liquide de chaque flacon.

Le liquide restant est agité vigoureusement de façon à mettre la levure en suspension, puis versé sur un petit filtre sans plis.

A l'aide d'une boucle de platine, un peu de dépôt de levure rassemblée au fond du filtre est prélevé et étalé en couches minces à la surface de baguettes de plâtre, contenues dans des tubes à essais munis d'un étranglement, contenant de l'eau dans la partie inférieure et bouchés

au coton. Les diverses séries de tubes ainsi préparés furent placées aux températures suivantes : 35° - 30° 5- 25° (17 - 18°), (10 - 11°), (5 - 6°).



N'ayant pas à notre disposition de thermostat de Panum, nous nous sommes servi, pour les températures élevées, d'étuves électriques. Pour les basses températures, les tubes ont été placés, soit dans des caves à température à peu près constante, soit dans des glacières.

Le temps nécessaire à la sporulation aux diverses températures étudiées est consigné dans le tableau III (le temps indiqué est celui au bout duquel les premières spores nettement formées sont apparues).

Sporulation sur plâtre. — Au bout de trente jours, les levures 27 (*Zygosaccharomyces*) et 22 n'avaient pas sporulé aux températures de (17 - 18°), 25° - 30° 5- 35° . La levure 21 n'a sporulé qu'à la température de 30° 5, et encore, au bout de 25 jours (au bout du trentième jour les cellules de ces levures étaient, pour la plupart, déformées).

Ces levures sporulant difficilement sur plâtre, nous n'avons pas continué leur étude sur ce support aux températures plus basses ; celle-ci a été faite sur tranches de carotte.

Sporulation sur carotte (levures 17, 21, 22). Tableau III bis.

Même sur carotte les levures 21 et 22 sporulent difficilement ; il n'y a jamais qu'un très petit nombre de cellules sporulées. Le nombre des spores varie de 1 à 2 par asque.

TABLEAU III

Temps nécessaire à la formation des ascospores sur plâtre humide

LEVURES	TEMPÉRATURES					
	35°	30° 5	25°	17°-18°	10-11°	5-6°
1	pas en 20 j.	23 h.	22 h.	28 h.	46 h.	6 j.
2	74 h.	29 h.	29 h.	29 h.	10 j.	pas en 21 j.
3	pas en 20 j.	23 h.	22 h.	26 h.	4 j.	9 j.
4	49 h.	23 h.	22 h.	23 h.	—	pas en 21 j.
5	pas	69 h.	45 h.	70 h.	4 j.	10 j.
6	pas	26 h.	23 h.	25 h.	5 j.	8 j.
7	pas	24 h.	21 h.	24 h.	6 j.	9 j.
8	pas	31 h.	28 h.	23 h.	6 j.	11 j.
9	pas	25 h.	27 h.	29 h.	4 j.	13 j.
10	32 h.	23 h.	21 h.	23 h.	6 j.	11 j.
11	pas	25 h.	23 h.	48 h.	57 h.	pas
12	pas	29 h.	24 h.	24 h.	6 j.	9 j.
14	pas	34 h.	24 h.	26 h.	4 j.	11 j.
15	pas	27 h.	23 h.	28 h.	10 j.	7 j.
16	pas	28 h.	23 h.	32 h.	5 j.	16 j.
17	pas	pas	pas	pas	5 j.	—
18	49 h.	25 h.	58 h.	66 h.	78 h.	9 j.
19	pas	25 h.	23 h.	32 h.	7 j.	pas
20	70 h.	23 h.	22 h.	34 h.	91 h.	9 j.
21	pas	25 j.	pas	pas	—	—
22	pas	pas	pas	pas	—	—
23	pas	44 h.	38 h.	46 h.	79 h.	11 j.
24	pas	27 h.	24 h.	34 h.	9 j.	10 j.
25	pas	8 j.	56 h.	58 h.	7 j.	pas

TABLEAU III bis

Temps nécessaire à la formation des ascospores sur tranches de carotte

LEVURES	TEMPÉRATURES					
	33°	28°	25°	16-17°	9°	5-6°
21	9 j.	9 j.	7 j.	8 j.	8 j.	8 j.
22	5 j.	5 j.	4 j.	5 j.	8 j.	9 j.
17	pas	69 h.	—	10 j.	18 j.	—

L'examen de ce tableau montre que le temps nécessaire à la formation des spores sur tranches de carotte varie peu avec la température, pour les levures 21 et 22.

TABLEAU IV

Températures maxima, optima et minima de formation des ascospores

LEVURES	TEMPÉRATURES		
	MAXIMA	OPTIMA	MINIMA
1	33-39°	25°	2-3°
2	36-37°	18-30°	8-9°
3	33-34°	25°	0-3°
4	36-37°	25°	6-7°
5	31-32°	25°	5°
6	31-32°	25°	0-3°
7	31-32°	25°	0-3°
8	33-34°	18°	3-5°
9	33-34°	30°	5°
10	36-37°	25°	5°
11	33-34°	25°	6-7°
12	33-34°	18-25°	0-3°
14	33-34°	25°	5°
15	33-34°	25°	3°
16	33-34°	25°	5°
18	38°	25°	5°
19	31-32°	25°	6-7°
20	36-37°	25°	0-3°
21	33-34°	25°	5°
22	33-34°	25°	5°
23	31-32°	25°	2-3°
24	31-32°	25°	2-4°
25	31-32°	25°	6-7°

SEXUALITÉ ET SPORULATION DE LA LEVURE 17

(*Zygosaccharomyces*)

A 33°, au bout de 50 heures, pas de phénomène de copulation.

A 28°, au bout de 50 heures, les phénomènes de copulation commencent à être visibles. Au bout de 55 heures, les spores commencent à se différencier.

Au bout de 69 heures, la sporulation devient abondante (une dizaine d'asques sporulés). On remarque également quelques cas de sporulation parthénogénétique (planche XI).

Il se produit d'abord un bourgeonnement intense, la culture s'accroît rapidement à la surface du milieu, un certain nombre de cellules se déforment, prennent un aspect réniforme, puis une forme en coin.

Les cellules qui vont copuler se réunissent par un petit bec, finalement la conjugaison s'opère.

A 16°, au bout de 7 jours, un cas de copulation. Au bout de 8 jours, quelques rares cellules sont à l'état de copulation. Au bout de 10 jours, on trouve quelques spores différenciées.

A 9°, les phénomènes de copulation se manifestent au bout de 14 jours ; les premières spores apparaissent au bout de 18 jours.

Essais de sporulation de la levure 13 (apiculée).

La sporulation des levures apiculées a donné lieu à de nombreuses recherches. Jusqu'à ces derniers temps, les levures du type apiculé, exception faite pour une levure trouvée par Lindner sur des fleurs de *Robinia pseudo-acacia*, étaient considérées comme asporogènes.

En 1929, Kufferath a décrit une technique qui lui a permis de mettre en évidence les spores du *Saccharomyces apiculatus* de Hansen. Pour cela, il se sert comme milieu de culture favorable à la sporulation de gélose farhydre (farine hydrolysée) et procède à l'examen des cellules après double coloration.

Cet auteur a montré :

« Que la sporulation chez le *S. apiculatus* est excessivement limitée. Les spores formées sont toujours très rares et n'apparaissent que dans les cultures âgées. Lesensemencements doivent toujours être faits avec des cultures très jeunes, démontrées dépourvues de spores par un examen microscopique.

La température, qui semble la plus favorable, est celle de 10-15° C.

L'alcalinisation du milieu semble favoriser légèrement les phénomènes de sporulation.

Kufferath n'a jamais trouvé qu'une seule spore dans l'asque. Celle-ci est acido-résistante.

La forme des spores est constante. Elles sont sphériques et ont de 3,5 à 4 μ de diamètre dans les préparations fixées ».

Formule de la gélose farhydre. — On pèse 10 grs de farine que l'on met dans un ballon avec 100 cm³ d'eau ordinaire. On y ajoute 1 cm³ 5 d'acide sulfurique concentré pur. On mélange bien le tout en chauffant au bain-marie ; puis on fait passer le ballon pendant dix minutes à l'autoclave à 120° C. On laisse refroidir. On ajoute alors au milieu acide et hydrolysé 2 gr. 5 de carbonate de calcium pur en poudre (on additionne le carbonate petit à petit pour éviter une effervescence trop vive). On agite pour bien opérer la combinaison et on laisse reposer pendant quelques heures ; il se forme un abondant précipité de sulfate de chaux. Le tout est filtré sur filtre Chardin épais, le filtrat clair est complété à 100 avec de l'eau, puis on ajoute 0 gr. 5 de carbonate de calcium. Le filtrat est passé à nouveau sur filtre Chardin, le liquide obtenu est complété à 100 avec de l'eau et additionné de gélose à 2 %. On répartit en tubes à essais et on stérilise à l'autoclave à 120°.

Au sortir de l'autoclave les tubes sont inclinés.

La gélose farhydre est un milieu acide très favorable au développement des levures.

La gélose farhydre alcaline est obtenue en ajoutant respectivement 3,5, 13, 23, 33 cm³ de soude normale à 250 cm³ de moût farhydre. Elle a donné à Kufferath des résultats inespérés au point de vue sporulation.

Ensemencement de la gélose inclinée en tubes à essais. — Onensemence la surface entière avec un peu de culture jeune, de manière à couvrir toute la surface de levures.

Il est indispensable d'avoir des cultures dépourvues de spores. On les réalise en faisant un ou deux pas-

sages, à un ou deux jours d'intervalle, sur gélose farhydre maintenue à la température du laboratoire.

Technique de la coloration. — On prend, avec un fil de platine, un peu de la culture à examiner et on dissocie la masse dans une goutte d'eau sur une lame de verre.

La culture étant étalée bien régulièrement, on la sèche en plaçant la lame dans une étuve sèche réglée à 100°. La dessiccation opère la fixation.

On prend ensuite la lame au moyen d'une pince de Cornet et on la recouvre entièrement de fuschine phéniquée.

La formule de la préparation de la fuschine phéniquée est la suivante :

Faire dissoudre 1 gr. de fuschine acide dans 15 grs d'alcool ordinaire : solution A ;

Faire dissoudre 5 cm³ d'acide phénique dans 100 cm³ d'eau : solution B ;

Mélanger les solutions A et B et laisser reposer pendant un jour en agitant de temps en temps. Filtrer sur papier filtre épais. Pour 100 cm³ de filtrat obtenu, ajouter 10 cm³ d'alcool ordinaire et 15 cm³ d'eau distillée.

La fuschine bien préparée ne donne aucun précipité sur les préparations et jouit d'un fort pouvoir colorant.

Tenant la lame par la pince de Cornet, on chauffe franchement la préparation dans la flamme jusqu'à ébullition violente. On rejette l'excès de colorant et, sans attendre un instant, on la plonge une ou deux secondes dans l'alcool ordinaire acidulé. Cet alcool acide est préparé en ajoutant à 100 cm³ d'alcool à 94°, 3 cm³ d'acide chlorhydrique pur, concentré et fumant.

Il convient de ne pas prolonger l'action de l'alcool acide. On lave aussitôt sous un courant d'eau, au robinet.

La préparation pâlit fortement. On la colore ensuite par le bleu de méthylène phéniqué (dissoudre 5 grs de bleu de méthylène dans 500 cm³ d'eau. Après dissolution, ajouter 500 cm³ d'eau phéniquée à 1 %. Pour l'emploi,

diluer le bleu ainsi obtenu avec une égale quantité d'eau).

On ne doit laisser agir le bleu qu'un instant.

Il suffit, pour obtenir d'excellentes préparations, de le laisser agir durant le temps que l'on met pour couvrir la lame de bleu.

On lave aussitôt dans un fort courant d'eau. On sèche la lame que l'on examine à l'immersion à l'huile de cèdre ».

Six tubes de gélose farhydre inclinée ont été ensemencés avec notre levure apiculée suivant les instructions données par Kufferath. Ils ont été abandonnés à la température du laboratoire (15-16°).

Au bout de 18 jours, 50 jours, 2 mois, on a fait un certain nombre de préparations colorées ; aucune n'a montré de spores.

Notre levure apiculée doit donc être rangée dans le genre *Pseudo-saccharomyces* Klöcker.

Sporulation sur moût gélatiné à surface inclinée. — Nous avons signalé précédemment que, sur 25 levures étudiées, 21 présentaient des cellules sporulées dans les cultures en stries sur gélatine inclinée, âgées de 28 jours.

Les levures n'ayant pas sporulé dans ces conditions sont les levures : 13 (apiculée), 19, 21, 22.

Sporulation sur moût gélosé à surface inclinée. — Les cultures en strie sur gélose inclinée, examinées microscopiquement au bout de sept mois, ont permis de trouver des cellules sporulées chez toutes nos levures, sauf chez les levures 13 et 2 (planches VIII à X).

Nous ne décrivons pas la forme, le nombre et la disposition des spores pour chacune des levures ayant sporulé ; il suffira de se reporter aux planches VIII à X. D'autre part, la description en sera donnée dans la description des espèces.

Sporulation des cellules des colonies géantes. — L'examen microscopique des cellules des colonies géantes a

été fait au bout de deux mois (au bout de ce temps, un certain nombre de colonies avaient déjà liquéfié la gélatine).

Cet examen a montré, chez beaucoup de levures, la présence de cellules sporulées. Nous l'avons complété pour chaque levure par l'épreuve de l'acido-résistance; celle-ci a été poursuivie par la suite chez les levures n'ayant pas donné de spores dans les colonies géantes.

Les levures 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 20, 24, 25 ont montré des spores dans les cellules des colonies géantes.

Les levures 2, 5, 13, 14, 17, 21, 22, 23 n'en avaient pas.

La levure 17 (*Zygosaccharomyces*) avait des cellules copulées, mais pas de spores différenciées.

Acido-résistance des ascospores, Beauverie (2).

La coloration des ascospores a été faite d'après la technique donnée par Klöcker (54).

Sur une lame porte-objet bien dégraissée on porte une parcelle de culture qu'on délaye dans une goutte d'eau, on étend, on laisse sécher, on fixe à la flamme

On colore ensuite à la fuchsine phéniquée à chaud (1 de fuchsine, 5 de phénol cristallisé, 10 d'alcool, 100 d'eau). Pour cela on verse la fuchsine sur la préparation, on chauffe la lame au-dessus d'une petite flamme jusqu'à l'apparition de vapeurs.

On lave à l'eau, on traite par l'acide sulfurique à 5 %, puis on lave de nouveau à l'eau (la fuchsine vire au jaune).

On examine à l'objectif à immersion. Les spores sont rouges, les autres cellules sont incolores.

*Toutes les levures de poiré, que nous avons pu faire sporuler, ont des spores acido-résistantes, sauf la levure 17 (*Zygosaccharomyces*) et la levure 2.*

Cette dernière levure se différencie nettement des autres par sa sporulation (température optima de sporulation élevée : 8-9° ; spores non acido-résistantes).

GERMINATION DES ASCOPORES

Les ascospores peuvent, selon les cas, être mises en liberté par rupture de la paroi de l'asque ou rester à l'intérieur de l'asque, dont la paroi ne se résorbe que dans les premiers stades de la germination. Celle-ci s'effectue généralement d'une manière très simple : les ascospores se gonflent et germent par bourgeonnement, à la manière des cellules végétatives.

Cependant, dans un certain nombre de levures dont les asques se forment sans conjugaison, les ascospores se fusionnent deux à deux au moment de germer. Cette fusion s'effectue exactement comme la conjugaison précédant la formation de l'asque dans certaines espèces et ce n'est qu'après ce phénomène que se produit le bourgeonnement, lequel s'opère le plus souvent au centre du canal réunissant les deux ascospores ou parfois dans l'une des ascospores anastomosées.

Le phénomène a été décrit pour la première fois par Hansen (31) dans le *Saccharomyces Ludwiggii*. Guilliermond, reprenant l'observation de Hansen sur le *S. Ludwiggii*, a démontré que cette fusion est accompagnée d'une conjugaison et présente, par conséquent, les caractères d'un véritable acte sexuel (27). Le même auteur a retrouvé une conjugaison semblable dans plusieurs levures : *Willia saturnus* et diverses espèces appartenant au genre *Saccharomyces* : levures de *Johannisberg II*, levure de *Pulque n° 1*, *Saccharomyces Chevalieri*, *Lindneri* et *Manginii*.

Les recherches ultérieures de son élève H. Marchand (72) ont montré que ce phénomène se retrouve également dans les *S. ellipsoideus*, *intermedius*, *validus*, *vini Muntzii*, *willianus*, *turbidans* et *Bayanus*, ainsi que dans la levure de *Johannisberg II*.

Nadson (77) a observé également cette même conjugaison dans le *Saccharomyces paradoxus* et tout récem-

ment Négroni (78) l'a retrouvée dans une nouvelle levure pathogène appartenant au genre *Saccharomyces*.

Ainsi, au point de vue de leur développement, il y a donc lieu de distinguer trois types de levures :

1° *Celles qui offrent une conjugaison à l'origine de l'asque* (genres : *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Nadsonia*, *Schizosaccharomyces*).

2° *Celles chez lesquelles la conjugaison est reportée à la germination des ascospores* (*Saccharomycodes*, *Willia saturnus* et un certain nombre de *Saccharomyces*).

3° *Celles qui n'offrent pas de sexualité*

Il nous a paru intéressant de rechercher si l'on pouvait trouver une conjugaison des ascospores, dans les levures de poires que nous avons isolées

Nous avons pu entreprendre cette étude grâce aux conseils éclairés de M. Guilliermond, qui a bien voulu tout d'abord nous indiquer la technique à suivre, puis par la suite contrôler le résultat de nos recherches.

Technique. — Pour obtenir la germination des ascospores, il est nécessaire de partir de cultures très riches en spores. La germination se fait commodément sur carotte. Il suffit de déposer un peu de culture sporulée sur une tranche de carotte stérile. Au bout de 15 à 16 heures, on commence à faire des prélèvements avec une anse de platine et l'on observe au microscope entre lame et lamelle, dans une goutte d'eau.

Ce mode opératoire ne permet pas de suivre les différentes phases de la germination, pour avoir une idée plus précise de celle-ci il est nécessaire d'opérer en chambre humide. Pour cela, on ensemence de la gélose au jus de carotte, préalablement fondue, avec un peu de culture. On mélange bien. On dépose une goutte de gélose ensemencée, sur une grande lamelle, puis on la dispose en goutte pendante au-dessus d'une chambre humide de Van Tieghem. On examine avec l'objectif à immersion.

Il ne faut pas avoir plus de 4 à 5 cellules dans le

champ. Les cellules, une fois repérées et dessinées, il n'y a plus qu'à suivre leur germination.

Gélose au jus de carotte. — Introduire 100 grs de carottes râpées dans un litre d'eau. Laisser digérer 2 heures. Filtrer. Faire bouillir le filtrat. Filtrer de nouveau. Ajouter 15 0/00 de gélose, après fusion coller au blanc d'œuf, filtrer à chaud, répartir en tubes à essais, stériliser.

Parmi les 23 espèces appartenant au genre *Saccharomyces* et ne présentant, par conséquent, aucun acte sexuel à l'origine de l'asque, nous avons pu constater des conjugaisons d'ascospores dans 12 formes. Ces 12 levures sont les levures 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 25. (Voir planches XII et XIII).

La planche XIII représente les différents stades de la germination de 2 ascospores provenant de la levure 9.

On voit que les ascospores après s'être gonflées dans l'asque, s'anastomosent par un canal qui les relie, puis la fusion s'achève et les deux ascospores ne forment plus qu'une grosse cellule (zygospore), qui germe en formant de nombreux bourgeons, en un point quelconque de leur surface. Pendant ce bourgeonnement la paroi de l'asque s'efface peu à peu par suite de sa résorption.

Cette conjugaison est loin d'être un phénomène général ; il y a de nombreux cas où les ascospores germent directement par parthénogénèse, sans s'être conjuguées, mais nous ne sommes pas en mesure de dire dans quelle proportion cette conjugaison s'effectue.

TRANSFORMATION DIRECTE DES ASCOSPORES EN ASQUES

Hansen a montré, pour la première fois, qu'après avoir placé des ascospores dans du moût de bière jusqu'à ce qu'elles aient gonflé, si on les place ensuite avant qu'elles n'aient commencé à bourgeonner sur bloc de plâtre, ces

ascospores, se trouvant brusquement inhibées dans leur germination se transforment directement en asques.

Guilliermond a montré ensuite que ce phénomène est très général et se produit non seulement dans les conditions indiquées par Hansen, mais aussi en cultures sur tranches de carotte. C'est ainsi que si l'on place des levures sporulées sur carotte, les ascospores germent en produisant par bourgeonnement de nouvelles cellules végétatives, mais à côté des ascospores qui germent normalement, on en trouve toujours un assez grand nombre qui, germant en retard dans ce milieu favorable à la sporulation, se transforment directement en asques sans bourgeonnement préalable.

Guilliermond a pu observer ainsi dans le *Schizosaccharomyces octosporus*, où la conjugaison se place à l'origine de l'asque, des ascospores qui se conjuguent directement sans s'être cloisonnées pour former de nouveaux asques et souvent à l'intérieur de l'ancien asque, avant la résorption de la paroi de celui-ci.

Le même auteur a constaté également dans le *Saccharomyces Ludwigii*, où la conjugaison se produit entre les ascospores au début de leur germination, des zygosporos qui, au lieu de bourgeonner, se transformaient en asques : les asques ainsi formés présentaient aussi des formes analogues à celles des asques des genres : *Zygosaccharomyces* et *Schizosaccharomyces* formés par deux renflements unis par un canal.

Guilliermond a retrouvé le même phénomène plus récemment dans la levure de Pulque.

Nous avons pu observer des phénomènes semblables dans la germination des ascospores des levures : 1, 9, 10, 18, 20, 24, 25 sur la tranche de carotte (planche XIV).

Sur ce milieu, à côté d'ascospores qui germaient normalement, on trouvait un certain nombre de zygosporos formées par la fusion de deux ascospores qui se transformaient directement en asques : ces asques présen-

taient la forme des asques d'un *Zygosaccharomyces*. Dans certains cas, ces asques possédaient trois renflements, ce qui semblait indiquer qu'ils avaient commencé à émettre un bourgeon.

Températures limites pour le bourgeonnement

Le bourgeonnement des levures ne peut se faire au delà de certaines températures minima et maxima. Ces températures limites sont assez variables avec les différentes espèces de levures.

Pour la détermination de ces températures limites, nous nous sommes servi de cultures sur tranches de carottes stériles.

Ces tranches ont étéensemencées à la boucle de platine à l'aide de cultures liquides, en disposant une trace macroscopiquement invisible de culture en un point bien déterminé de la surface.

Après ensemencement, les tubes ont été placés, pour les températures élevées, dans des étuves électriques réglées aux températures suivantes : 33°, 35°, 37°, 39°, 41°, 44°, 47°.

Pour les basses températures, les tubes furent déposés dans une glacière (température 2-3°) et dans une chambre froide des Etablissements Frigoriques Lyonnais (température 4°).

Les cultures ont été examinées au bout de 10 jours.

(L'apparition d'une colonie blanche au point d'inoculation est l'indice d'une multiplication de la levure par bourgeonnement : au cas contraire, si aucune colonie n'est visible, c'est qu'il n'y a pas eu de bourgeonnement à la température étudiée).

Les températures limites de bourgeonnement pour nos 25 levures sont consignées dans le tableau V

L'examen de ce tableau montre que la température

maxima de bourgeonnement est, pour la plupart de nos levures, comprise entre 38 et 39°. Elle monte à 42-43° avec la levure 12 ; quant aux levures 1, 2, 4, 18, 19, 20, elles ne cessent de bourgeonner que vers 45-46°. Si l'on se reporte au tableau de Hansen, reproduit par Guiliérmond (24), donnant les températures maxima pour un certain nombre d'espèces de levures, on voit que ces six levures se rapprocheraient du *S. Marxianus* dont la température limite est de 46-47°.

TABLEAU V

Températures limites pour le bourgeonnement

LEVURES	TEMPÉ- RATURE MAXIMA	TEMPÉ- RATURE MINIMA	LEVURES	TEMPÉ- RATURE MAXIMA	TEMPÉ- RATURE MINIMA
1	45-46°	3°	14	38-39°	3°
2	45-46°	3°	15	38-39°	3°
3	38-39°	0-2°	16	38-39°	3°
4	45-46°	3°	17	38-39°	
5	38-39°	0-2°	18	45-46°	3°
6	38-39°	0-2°	19	45-46°	3°
7	38-39°	3°	20	45-46°	3°
8	38-39°	3°	21	38-39°	3°
9	38-39°	0-2°	22	38-39°	3°
10	38-39°	3°	23	38-39°	3°
11	38-39°	0-2°	24	38-39°	3°
12	42-43°	3°	25	38-39°	0-2°
13	29-32°	0-2°			

La levure 13 (apiculée) cesse de bourgeonner à une température relativement basse (29-32°).

La température minima est, en général, voisine de 3°. Elle est comprise entre 0 et 2° pour les levures 3, 5, 6, 9, 11, 13, 25.

III. - Etude physiologique

Résistance à la chaleur - Température mortelle

L'action de la chaleur sur les levures a fait l'objet de recherches de la part de Kayser (39), p. 13, et (40).

Ce savant a constaté « que les levures, chauffées en milieu liquide, meurent entre 55 et 60°, après cinq minutes de chauffage. Quelques-unes comme les levures apiculées, plus fragiles, succombent entre 45 et 48°, d'autres résistent encore à 60°.

« En général, la présence de spores dans la levure augmente sa résistance de 5° ».

D'après Boullanger, les levures constamment rajeunies dans des milieux artificiels perdraient, avec le temps, leur résistance à la chaleur.

D'autre part, on conçoit aisément que l'acidité du milieu renforce l'action de la chaleur ; ceci nous a incité à étudier l'action de la chaleur en utilisant comme milieux de culture :

- 1° *De l'eau de levure ayant une acidité connue ;*
- 2° *Un moût dilué dont nous avons dosé l'acidité.*

Comme mode opératoire, la plupart des auteurs qui ont étudié les levures opèrent à la manière de Kayser, en plongeant des tubes capillaires ou des ampoules scellées contenant une dilution de levure, dans de l'eau chauffée à la température convenable.

La levure ainsi traitée sert ensuite à ensementer un milieu nutritif et l'on examine s'il se produit ou non une fermentation.

Nous avons préféré utiliser la technique d'Osterwalder, parce qu'elle donne des renseignements beaucoup plus intéressants au point de vue pratique, la levure étant chauffée dans le milieu où elle vit (moût de poires); d'autre part, la température lue au thermomètre est bien celle du milieu contenant la levure et non pas celle du bain-marie.

Nous avons opéré de la façon suivante : 22 cm³ d'eau de levure contenant 30 0/00 de glucose et 2 0/00 d'acide malique ont été introduits dans trois séries de tubes à essais de 180×15 mm. bouchés au coton.

L'acidité de ce milieu était de 2 gr. 27 par litre, exprimée en acide malique.

Après stérilisation, chaque série de tubes a étéensemencée à la pipette avec les 25 levures de poiré, à l'aide de dix gouttes d'une culture jeune, âgée de 14 jours.

A chaque série on a ajouté deux tubes témoins non ensemencés, munis d'un thermomètre plongeant dans le liquide par son réservoir et une partie de sa tige, et fixé au tube par un bouchon de coton.

Après avoir mis la levure en suspension dans le liquide par rotation des tubes entre les mains, ces derniers ont été, ainsi que les tubes témoins, disposés circulairement dans un panier métallique et plongés dans l'eau chaude contenue dans un bain-marie cylindrique.

La première série de tubes a été plongée dans l'eau à 40°, puis on a fait monter la température à 50°, en un quart d'heure (température intérieure du liquide contenu dans les tubes et donnée par les thermomètres des tubes témoins). La température de 50° atteinte, les tubes ont été aussitôt retirés du bain-marie, essuyés et abandonnés à la température du laboratoire (17-18°).

La deuxième série a été plongée dans l'eau à 45°, on a porté en un quart d'heure la température à 55°.

La troisième série a été plongée dans l'eau à 50° et les tubes ont été sortis quand la température du milieu nutritif a atteint 60°.

Les tubes ont ensuite été examinés tous les jours, pendant quinze jours, au point de vue fermentation.

Pour tous les cas douteux, nous avons procédé au dosage de l'alcool par la méthode chimique de Martin.

Les mêmes essais ont été refaits avec du moût de poires de Blanchard amené avec de l'eau à la densité de 1.030.

L'acidité de ce moût, après dilution et stérilisation, était de 3 grs par litre exprimée en $\text{SO}^4 \text{H}^2$.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Température mortelle

N°	EAU DE LEVURE			MOÛT DILUÉ		
	<i>Température de chauffage</i>			<i>Température de chauffage</i>		
	50°	55°	60°	50°	55°	60°
			Fermentation			
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	—
3	+	+	+	+	+	—
4	+	+	+	+	+	—
5	+	+	—	+	—	—
6	+	+	+	+	+	—
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	—
9	+	+	+	+	+	—
10	+	+	+	+	+	—
11	+	+	+	+	+	—
12	+	+	+	+	+	—
13	+	—	—	+	—	—
14	+	+	—	+	+	—
15	+	+	—	+	—	—
16	+	+	+	+	+	—
17	+	+	+	+	+	—
18	+	+	+	+	+	—
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	—	—	+	—	—
22	+	+	—	+	—	—
23	+	+	+	+	+	—
24	+	+	—	+	+	—
25	+	+	+	+	+	—

Signe + fermentation positive.
Signe — fermentation négative.

Eau de levure. — Toutes les levures étudiées résistent à la température de 50°.

Température de 55°, la levure 13 (apiculée) et la levure 21 sont tuées.

Température de 60°. Sont tuées les levures 5, 14, 15, 22, 24.

Moût dilué. — A 50°, toutes les levures résistent. A 55°, sont tuées les levures 5, 13, 15, 21, 22. A 60°, seules les levures 1, 7, 19, 20 résistent.

Le milieu étant plus acide que le précédent, la résistance à la chaleur devient moindre ; cependant, quatre levures sur vingt-cinq résistent à 60°.

A 50° le départ de la fermentation pour les levures 13 et 17 est en retard d'une vingtaine d'heures sur celui des autres levures.

Température optimum de fermentation

La température optimum de fermentation pour une levure est celle qui donne la durée de fermentation la plus courte, autrement dit celle qui permet à la levure de transformer le sucre en alcool dans le minimum de temps.

Les travaux de Warcollier et de Kayser nous ont appris que, dans la fabrication des cidres et poirés destinés à la consommation, il faut rechercher les levures à faible atténuation, que les températures les plus favorables à l'obtention de produits bouquetés, recherchés par le consommateur, sont comprises entre 5 et 8°.

Il n'en est pas de même dans la fermentation des moûts de poires destinés à la fabrication de l'alcool neutre.

La distillerie recherche les levures à forte atténuation, donnant une chute rapide du sucre, de façon à augmenter la capacité de production de l'usine.

On arrive à obtenir une fermentation très rapide en

additionnant le moût de sels nutritifs (phosphate d'ammoniaque), car les moûts de pommes et de poires sont très pauvres en azote, et en maintenant la température des cuves de fermentation à 28-30°.

La connaissance de la température optimum de fermentation des diverses levures de poiré a donc une grosse importance au point de vue pratique.

Pour la détermination de cette température optimum, nous avons opéré de la façon suivante :

Du moût de poires de Fer a été amené avec de l'eau à la densité de 1030, de façon à déterminer cet optimum avec des moûts analogues à ceux employés industriellement.

Le moût a été réparti, à raison de 85 cm³, dans quatre séries de flacons de 125 cm³ et stérilisé une heure à la vapeur fluente.

Les flacons ont étéensemencés à la boucle de platine, avec une quantité de levure aussi égale que possible, à partir de cultures âgées de 7 jours.

Ils ont été munis de tubes fermentateurs et placés dans des étuves électriques réglées aux températures suivantes : 21°, 25°, 29°, 33°. Au bout de 6 jours les flacons ont été retirés des étuves et l'on a déterminé la densité du liquide en fermentation à l'aide de la balance aréothermique, après avoir chassé le CO².

L'examen du tableau VII montre que 17 levures ont leur optimum situé aux environs de 29°.

Une levure a son optimum qui descend à 21°.

Deux levures ont leur optimum à 25°.

Quatre levures ont leur optimum à 33°.

Une levure a son optimum compris entre 29 et 33°.

On peut donc en conclure que, pour l'ensemble des levures de poiré, la température optimum de fermentation est située aux environs de 29°.

La température des cuves de fermentation (28-30°) distilleries d'alcool correspond bien à cet optimum.

TABEAU VII

<i>Température optimum de fermentation</i>					
LEVURES	TEMPÉRATURES				Tempér. optimum de fermenta- tion
	33° Densité	29° Densité	25° Densité	21° Densité	
1	1008,8	1006	1007,2	1008,2	29°
2	1015	1015	1018	1020	29-33°
3	1016,5	1008,2	1011	1014,3	29°
4	1007,1	1008,5	1013,5	1017,2	33°
5	1009,5	1005,5	1009,5	1013	29°
6	1006	1004,5	1009	1010	29°
7	1011	1006,5	1012,5	1015,8	29°
8	1006,8	1004	1006,5	1007,8	29°
9	1008	1005	1007	1008	29°
10	1007,2	1006	1008,5	1010	29°
11	1009,5	1007,8	1013,8	1015,5	25-29°
12	1007,3	1004	1004,8	1005	33°
13	1004	1020	1020	1020	21°
14	1027	1016	1010,2	1008,7	29°
15	1015	1004,5	1007,5	1009	29°
16	1021,5	1004,5	1008	1009,4	29°
17	1016	1015	1019	1021	29°
18	1008	1007	1014	1018	33°
19	1004	1005	1007	1009	33°
20	1002	1003	1008	1010	25°
21	1026	1023,5	1011	1013,3	25°
22	1025	1020,5	1010	1012,5	29°
23	1020,5	1007,5	1010	1014	29°
24	1010,5	1003,3	1007	1008	29°
25	1013	1008,5	1009,5	1010,5	

Maximum d'alcool produit

Les levures de vin habituées à vivre dans des moûts riches en sucre peuvent produire jusqu'à 16-17° d'alcool.

Kayser indique que les solutions saccharines à 300 grs de sucre par litre peuvent être considérées comme renfermant la quantité maxima de sucre fermentescible.

La teneur moyenne en sucre des moûts de poires pouvant être évaluée, d'après les nombreuses analyses faites

par Truelle (106), à 120 grs, la teneur maximum à 150 grs, il était à présumer que des levures donnant normalement 6° d'alcool ne pourraient transformer des doses élevées de sucre. Aussi, dans un premier essai, nous avons cherché à voir comment se comporteraient les levures de poiré, dans un moût titrant environ 200 grs de sucre.

Du moût de poires de Blanchard de densité 1.070 a été additionné de 55 grs de glucose pur et 1 gr. de phosphate d'ammoniaque par litre. (L'addition de phosphate d'ammoniaque a été faite pour que la transformation du sucre en alcool ne soit pas arrêtée par le manque d'aliment azoté.)

Le moût ainsi enrichi titrait 195 grs de sucres totaux. Il a été réparti à raison de 140 cm³ dans de grands tubes mesurant 38 cm. de hauteur et 35 mm. de diamètre. Chaque tube a été muni d'un mustimètre, bouché au coton, stérilisé une heure à la vapeur fluente et ensemencé à la pipette avec un cm³ de culture âgée de 20 jours.

On a ajouté un tube témoin qui n'a pas été ensemencé.

Les tubes ont été abandonnés à la température du laboratoire (18-19°). On a suivi la fermentation à l'aide des indications données par les densimètres. La fermentation terminée (le dégagement des bulles de CO² ayant cessé), on a procédé à l'analyse du liquide fermenté.

L'alcool a été titré avec l'alcoomètre au 1/5 de degré après distillation, le sucre restant par la méthode de Bertrand, l'acidité totale d'après la méthode utilisée à la Station pomologique de Caen (111), p. 489.

Les résultats trouvés sont consignés dans le tableau VIII.

On constate que les meilleures levures : 4, 15, 19, ont donné 9°7 d'alcool (soit environ 19 gr. 6 de sucre transformé pour 1° d'alcool). Il est à remarquer que les tubes étant bouchés au coton, il y a eu une petite perte d'alcool par évaporation.

TABLEAU VIII
Maximum d'alcool produit
(1^{er} essai)

LEVURES	MOUT		LIQUIDE FERMENTÉ				Durée de la fermentation	Rapport sucre alcool
	sucres total	acidité totale en SO ⁴ H ²	densité au mustimètre	alcool % en volume	sucres restant par litre	acidité totale en SO ⁴ H ²		
1	195 gr.	8 gr.	1.010	9,4	5 g. 9	5 g. 3	20 j.	20,1
2	»	»	1.009	9,5	5	9,2	20	20
3	»	»	1.011	8,8	5,2	8,9	20	21,5
4	»	»	1.007	9,7	5,1	9,3	20	19,6
5	»	»	1.012	9,4	5	9,2	20	20,2
6	»	»	1.012	9,5	7,1	9,2	20	19,7
7	»	»	1.011	8,8	5,8	9,3	20	21,5
8	»	»	1.010	9,5	4,9	8,9	20	20
9	»	»	1.010	9,6	5,4	8,8	20	19,75
10	»	»	1.011	9,5	4,9	8,9	20	20
11	»	»	1.011	9,3	4,3	8,8	20	20,5
12	»	»	1.012	9,2	6,2	9,3	20	20,5
13	»	»	1.035	5,2	73,0	9,5	82	23,7
14	»	»	1.010	9,3	4,6	8,8	20	20,5
15	»	»	1.010	9,7	4,6	8,9	20	20,1
16	»	»	1.011	8,8	5	8,9	20	22,1
17	»	»	1.045	5,2	92,3	8,7	40	19,75
18	»	»	1.010	9,6	6	9,3	20	19,6
19	»	»	1.009	9,7	6,1	9,8	28	19,5
20	»	»	1.010	9,6	3	8,5	25	20
21	»	»	1.012	8,3	6	9,5	55	23,3
22	»	»	1.010	8,9	6	9,2	40	22,7
23	»	»	1.010	9,2	3,2	9	25	20,8
24	»	»	1.012	9,1	2,5	9,1	28	21,1
25	»	»	1.010	9,4	6,3	9	40	20
(2 ^e essai)								
4	240	8,2	1.009	12	9,1	9,9	82	19,25
15	»	»	1.023	9,3	48	9,5	82	20,6

L'alcool formé n'a pas dépassé 5°2 chez les levures : 13 (apiculée), 17 (*Zygosaccharomyces*) qui ont laissé une forte proportion de sucre. L'action antiseptique du sucre a été marquée par un ralentissement de la fermentation chez un certain nombre de levures.

Alors qu'avec les meilleures levures la fermentation était terminée au bout de 20 jours, celle-ci a duré :

25 jours avec les levures 1, 20, 23.	
28	— 19, 24.
40	— 17, 22, 25.
55	— 21.
82	— 13.

Dans l'ensemble, on peut dire qu'avec des moûts titrant 200 grs de sucres totaux, les levures de poiré peuvent pousser la production d'alcool jusque vers 9°5.

Il était intéressant de savoir si les meilleures levures (4, 15, 19) étaient susceptibles de pousser beaucoup plus loin la production de l'alcool, avec des moûts encore plus riches en sucre.

Nous avons fait, pour cela, un second essai avec les levures 4 et 15.

Deuxième essai. — Du moût de poires de Blanchard de densité 1.078, additionné de 90 grs de glucose par litre et de 1 0/00 de phosphate d'ammoniaque, a été réparti à raison de 140 cm³ dans trois tubes mustimétriques.

Après stérilisation, un tube fut conservé comme témoin pour l'analyse du moût. Celui-ci dosait 240 grs de sucres totaux. Les deux autres furentensemencés avec les levures 4 et 15 et les bouchons de coton remplacés par des bouchons de liège munis de tubes fermentateurs, de façon à diminuer les pertes d'alcool par évaporation.

Au bout de 82 jours, la fermentation paraissant terminée dans les deux tubesensemencés, nous avons procédé au dosage du liquide fermenté.

La levure 4 a donné 12° d'alcool. La levure 15 seulement 9°3, alors que dans l'essai précédent elle en avait

donné 9°7. Il y a là une action inhibitrice du sucre tout à fait évidente.

Pour les deux levures, la forte teneur en sucre a augmenté considérablement la durée de la fermentation (82 jours au lieu de 20 jours).

Nous pouvons donc conclure, à la suite de cet essai, que la teneur de 12 % d'alcool semble être le maximum de ce que peuvent produire les levures de poiré avec des moûts enrichis en sucre.

Les levures qui, comme la levure 4 sont susceptibles de faire fermenter entièrement des moûts riches en sucre sont très intéressantes au point de vue pratique. Elles ont leur utilisation tout indiquée dans la fermentation des moûts concentrés.

La fermentation de ces moûts a été étudiée par Kayser (*Cidrerie Française*, juin 1928, janvier 1929, juin 1929, mars 1930). Avec des levures de cidreensemencées dans des moûts concentrés de pommes, ou dans des moûts enrichis en sucre, Kayser a obtenu des rendements en alcool ne dépassant pas 10,7 % en volume.

Par ailleurs, Castan (10), en ensemençant un moût contenant 317 gr. 1 de sucre par litre avec une levure de cidre (levure d'Engishofen) a pu obtenir 11,05 % d'alcool en volume.

Résistance à l'acidité

Nous avons mis à profit, au début de cette étude, l'influence de l'acidité sur les différentes races de levure pour en opérer un premier triage.

Duclaux a montré que lorsqu'on enseme avec une même dose, diverses levures, dans un moût sucré, contenant des quantités croissantes d'acide tartrique, allant de 1 à 3 %, et qu'on note le nombre d'heures au bout duquel la fermentation se déclare, on trouve des différences sensibles selon les levures considérées. Ce savant

a proposé une méthode de différenciation des levures basée sur l'action des acides organiques.

Kayser (42), p. 103, fait remarquer que si l'on utilise des doses égales des trois acides : citrique, tartrique et malique, c'est l'acide malique qui est le plus favorable à la levure.

Beaucoup de levures ne seraient pas plus gênées par une dose de 6 à 7 grs d'acide malique que par une dose quatre fois moindre. Toutefois, avec une acidité plus élevée, on a une production plus importante d'acides volatils et d'éthers.

Les levures les plus résistantes à l'acidité seraient celles qui en produisent le plus.

Les levures sauvages sont beaucoup plus résistantes à l'acidité que les levures sélectionnées.

Enfin, rappelons que l'acidité des milieux de culture protège les levures contre les bactéries beaucoup plus sensibles.

L'étude de l'influence de l'acidité doit être faite d'une façon assez minutieuse. Il faut éliminer les causes permettant à la levure de lutter contre l'acidité du milieu.

Pour opérer toujours dans les mêmes conditions, il est nécessaire d'avoir des tubes de mêmes dimensions, contenant la même quantité de liquide et stérilisés tous en même temps.

L'ensemencement doit être fait avec une culture très jeune et une quantité de semence très minime et toujours égale.

MODE OPÉRATOIRE. — Quatre séries de tubes à essais de 160×15 mm. ont reçu 10 cm³ d'eau de levure additionnée de 5 % de glucose et d'une dose variable d'acide malique (l'eau de levure utilisée avait une acidité de 0 gr. 26 par litre exprimée en acide malique).

Cette acidité initiale a été portée par addition d'acide malique à :

15 grs par litre pour la 1 ^{re} série (Ph. 3,2)	
20 — — — 2 ^e série (Ph. 3,2)	
25 — — — 3 ^e série (Ph. 3)	
30 — — — 4 ^e série (Ph. 3)	

Les tubes ont été ensemencés avec une culture jeune, âgée de 8 jours. L'ensemencement a été fait à la boucle de platine, de façon à introduire une quantité minime et aussi égale que possible de semence.

Les tubes ont été abandonnés à la température du laboratoire (16-17°). On a noté pour chacun d'eux l'heure du départ de la fermentation. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Nombre d'heures nécessaire au départ de la fermentation

QUANTITÉS D'ACIDE MALIQUE PAR LITRE				
N° DE LA LEVURE	15 gr.	20 gr.	25 gr.	30 gr.
1	80 h.	80 h.	93 h.	98 h.
2	105 h.	117 h.	117 h.	117 h.
3	117 h.	117 h.	121 h.	146 h.
4	93 h.	93 h.	93 h.	93 h.
5	98 h.	120 h.	117 h.	141 h.
6	98 h.	93 h.	98 h.	141 h.
7	105 h.	105 h.	117 h.	141 h.
8	123 h.	121 h.	154 h.	164 h.
9	117 h.	117 h.	154 h.	154 h.
10	117 h.	130 h.	154 h.	163 h.
11	117 h.	117 h.	121 h.	121 h.
12	117 h.	117 h.	121 h.	141 h.
13	72 h.	72 h.	75 h.	93 h.
14	72 h.	110 h.	110 h.	141 h.
15	117 h.	121 gr.	154 h.	194 h.
16	117 h.	121 gr.	121 h.	164 h.
17	—	—	—	—
18	86 h.	110 h.	110 h.	123 h.
19	141 h.	141 h.	121 h.	154 h.
20	72 h.	75 h.	75 h.	93 h.
21	117 h.	121 h.	141 h.	141 h.
22	117 h.	121 h.	121 h.	164 h.
23	236 h.	236 h.	230 h.	240 h.
24	140 h.	140 h.	140 h.	144 h.
25	72 h.	117 h.	121 h.	141 h.

La levure 17 (*Zygosaccharomyces*) a été la plus sensible à l'action de l'acidité ; aucune fermentation ne s'est déclarée dans les tubes où elle avait été ensemencée. La fermentation de la levure 23 a été très retardée.

Les levures : 13 (apiculée), 4, 20, 1 sont peu gênées par l'acidité.

La levure 17 n'ayant pas donné de fermentation, on a refait l'essai avec de l'eau de levure sucrée additionnée de 6, 9, 12 grs d'acide malique par litre.

Les tubes à 6 et 9 grs d'acide étaient en fermentation au bout de 144 heures, à 16°.

La fermentation dans le milieu à 12 grs d'acide malique ne put être perçue qu'en donnant de petits chocs à la base du tube ; on vit, alors, des bulles de CO² partir du fond pour remonter à la surface.

Action sur les sucres

La fermentation des sucres est un des caractères les plus importants pour l'identification des levures industrielles.

La presque totalité des levures de brasserie, cidrerie, vinification, distillerie, appartient au genre *Saccharomyces* Meyen. Or ce genre contient un grand nombre d'espèces qui ont été classées par Hansen et Guilliermond en six sous-groupes, d'après la fermentation des sucres.

La fermentescibilité des divers sucres par les levures constitue une propriété physiologique de première importance. Elle est liée pour les di et les polysaccharides à la sécrétion de diastases spéciales.

La levure apiculée, par exemple, ne secrète pas de sucrase et ne peut faire fermenter le saccharose.

La connaissance des levures sans sucrase peut être intéressante en cidrerie pour la fabrication des cidres et des poirés mousseux.

Ces levures, au contraire, n'ont aucun intérêt en distillerie où la fermentation du sucre doit être poussée à fond.

Etant donné l'importance de ce caractère, nous avons apporté beaucoup de soin à sa détermination.

Nous avons recherché la façon dont se comportent les levures de poiré vis-à-vis des sucres suivants : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, raffinose ; nous avons complété cette étude par l'action sur un polysaccharide, la dextrine.

Comme milieu de culture, nous nous sommes servi de l'eau de levure. Les sucres utilisés ont été des sucres purs de la Maison Poulenc.

Comme critérium de la fermentation nous nous sommes servi du dégagement de CO_2 et de l'alcool formé.

Nous avons constaté, au cours de cette étude, que l'unique observation du dégagement de CO_2 peut conduire à des erreurs.

Dans la fermentation du galactose, les levures 1 et 18, dont les cultures n'avaient montré aucun dégagement de CO_2 accusaient, après dosage de l'alcool, respectivement 1°1 et 1°, alors que les levures, qui avaient fait fermenter entièrement ce sucre, donnaient un titre alcoolique de 2°5 et 2°6.

Ces deux levures avaient donc fait fermenter plus du tiers du sucre qui leur était offert.

Lorsque la fermentation est lente, le CO_2 se dissout dans le liquide, son dégagement n'a lieu qu'après saturation ; il est donc nécessaire de compléter l'observation du dégagement de CO_2 , soit par le dosage de celui-ci, soit par celui du sucre disparu, soit encore par celui de l'alcool formé.

Vu le nombre considérable de dosages d'alcool que nous avons eu à effectuer au cours de cette étude, nous nous sommes servi de la méthode ébullioscopique. Celle-ci n'est pas d'une exactitude rigoureuse, cependant, comme le titre alcoolique du liquide fermenté ne dépassait guère 2°7, cette méthode, d'après Dujardin (17), p. 454, est préférable à l'emploi de l'alcoolomètre après distillation.

Du reste, pour corriger l'effet de la pression, nous avons pris le point d'ébullition d'un échantillon témoin non ensemencé et non pas celui de l'eau.

MONOSACCHARIDES. — De l'eau de levure additionnée de 1 0/00 d'acide malique et de 4 % du sucre à étudier a été répartie à raison de 50 cm³ dans des flacons de 125 cm³ bouchés au coton.

La solution a été stérilisée un quart d'heure à 110°. Chaque flacon a été ensuite ensemencé à la pipette avec dix gouttes de culture, puis le bouchon de coton remplacé par un bouchon traversé par un tube fermentateur.

Un certain nombre de flacons non ensemencés ont été conservés comme témoins.

Les flacons ont été abandonnés à la température du laboratoire. Nous avons noté le dégagement de CO² et, au bout de 11 à 12 jours après l'ensemencement, nous avons procédé au dosage de l'alcool.

Glucose. — Toutes les levures que nous avons étudiées font fermenter le glucose; la levure 17 moins rapidement que les autres.

Lévulose. — Toutes ces levures font fermenter le lévulose.

Galactose. — Les levures 13 (apiculée), 17 (Zygosaccharomyces) ne font pas fermenter le galactose, 1 et 18 moins rapidement que les autres.

Di et Trisaccharides.

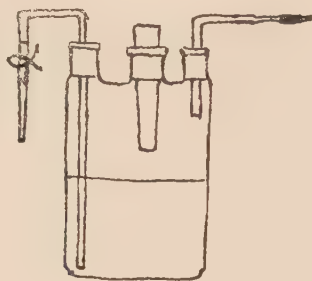
Avec les bioses et les trioses, la stérilisation du sucre, en solution dans l'eau de levure acidulée, amènerait son dédoublement.

Il est nécessaire de stériliser à part l'eau de levure et la solution de sucre, puis de les mélanger aseptiquement à froid.

Nous avons d'abord essayé la stérilisation du sucre à sec, en le maintenant 30 minutes à la température de 105° dans une étuve électrique : Steiner (91), p. 28. Un certain nombre de flacons ayant été infectés par les

moisissures, nous avons finalement opéré la stérilisation du sucre en le faisant passer à travers une bougie de porcelaine.

Nous nous sommes servi pour cela d'un flacon de Woolf à trois tubulures, d'un litre et demi.



La tubulure centrale fut garnie d'un bouchon traversé par une bougie filtrante, l'une des tubulures latérales munie d'une pipette fermée avec une pince de Mohr, l'autre d'un bouchon portant un tube coudé avec étranglement bouché au coton. Après avoir introduit l'eau de levure dans le flacon ainsi disposé, ce dernier fut stérilisé, un quart d'heure à 115° .

Après refroidissement le flacon a été relié par le tube coudé à une trompe pour faire passer la solution sucrée à travers la bougie.

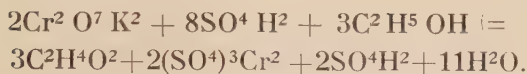
Après avoir bien mélangé l'eau de levure et le sucre, la solution a été introduite par la pipette (en comprimant de l'air à l'intérieur du flacon) à raison de 50 cm^3 , dans des flacons de 125 cm^3 .

Ce procédé très simple nous a donné d'excellents résultats.

Pour le raffinose, en raison de la cherté de ce sucre, nous avons opéré en tubes à essais contenant 13 cm^3 d'eau de levure sucrée. Le dosage de l'alcool a été fait par la méthode chimique de Martin (73).

Cette méthode est basée sur la transformation complète de l'alcool en acide acétique, sous l'action du bi-

chromate de potasse, en présence de $\text{SO}^4 \text{H}^2$, d'après la réaction.



Saccharose. — Toutes les levures étudiées font fermenter le saccharose, sauf les levures : 13 (apiculéc), 17 (*Zygosaccharomyces*).

Ces deux levures ne secrètent donc pas de sucrase.

Maltose. — Les levures 13, 17, 21, 22, ne font pas fermenter le maltose, elles ne secrètent pas de maltase.

Lactose. — Aucune des levures étudiées ne fait fermenter le lactose.

Raffinose. — Les levures 1, 13, 20, ne font pas fermenter le raffinose; elles ne secrètent ni mélitriase, ni mélibiase. Avec les levures 2, 4, 18, 19, le raffinose est fermenté pour un tiers de son poids. Ces levures ne secrètent pas de mélibiase.

Les autres levures font fermenter le raffinose.

FERMENTATION DE LA DEXTRENE.

Nous avons utilisé de la dextrine pure précipitée par l'alcool.

Nous en avons dissous 80 grs dans 700 cm^3 d'eau chaude. La dissolution a été à peu près totale. Nous avons filtré sur papier, puis à la bougie et mélangé avec un volume double d'eau de levure acidifiée, dans le flacon de Woolf, puis réparti dans des flacons de 125 cm^3 . Il n'y a pas eu de fermentation avec les levures de poiré que nous avons étudiées.

Les résultats obtenus sont condensés dans le tableau X.

D'après la classification de Guilliermond, les levures de brasserie, cidrerie, distillerie, vinification appartiennent, pour la plupart, au troisième groupe.

Les caractères de ce groupe sont les suivants: « Levures bourgeonnantes formant dans les liquides sucrés, d'abord un dépôt et plus tard seulement, un voile plus

« ou moins visqueux sans bulles d'air. Ascospores ronds ou ovales avec une ou deux membranes, germant par bourgeonnement, produisant généralement de l'alcool. »

TABLEAU X

Nature des sucres et hydrates de carbone susceptibles de fermenter

Levures	Sucre							
	Glucose	Levulose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Inuline	H de C Dextrine
1	+	+	—	+	—	—	—	—
2	+	+	—	+	+	—	1-3	—
3	+	+	—	+	+	—	—	—
4	+	+	—	+	+	—	1-3	—
5	+	+	—	+	+	—	+	—
6	+	+	—	+	+	—	+	—
7	+	+	—	+	+	—	+	—
8	+	+	+	+	+	—	—	—
9	+	+	—	+	+	—	—	—
10	+	+	—	+	+	—	—	—
11	+	+	—	+	+	—	+	—
12	+	+	—	+	+	—	—	—
13	+	+	—	+	+	—	—	—
14	+	+	+	+	+	—	—	—
15	+	+	+	+	+	—	+	—
16	+	+	+	+	+	—	+	—
17	+	+	—	+	+	—	—	—
18	+	+	+	+	+	—	1-3	—
19	+	+	+	+	+	—	1-3	—
20	+	+	—	+	+	—	—	—
21	+	+	—	+	+	—	+	—
22	+	+	+	+	+	—	+	—
23	+	+	+	+	+	—	+	—
24	+	+	+	+	+	—	+	—
25	+	+	+	+	+	—	+	—

Ce groupe comprend quatre genres :

« *G. Saccharomycodes*. — Cellules se divisant par un procédé intermédiaire entre le bourgeonnement et le cloisonnement.

« *G. Saccharomycopsis*. — Ascospores à deux membranes.

« *G. Saccharomyces*. — Ascospores à une seule membrane germant par bourgeonnement, quelquefois formation de rudiments mycéliens.

« *G. Hansenia*. — Cellules apiculées. Asques à une seule ascospore. »

Le genre *Saccharomyces* a été divisé par Hansen en six sous-groupes, d'après la nature du sucre que les levures font fermenter.

1^{er} sous-groupe. — *Saccharomyces* faisant fermenter les dextrose, maltose et saccharose, mais pas le lactose.

Les levures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 25 appartiennent à ce sous-groupe.

2^e sous-groupe. — *Saccharomyces* faisant fermenter les dextrose et saccharose, mais ni le maltosé, ni le lactose.

Les levures 21, 22 font partie de ce groupe. Il reste les levures 17 et 13.

La levure 17 appartient au deuxième groupe :

Levures bourgeonnantes, phénomènes sexuels, quelquefois à l'état de vestiges seulement à l'origine de l'asque.

Et au genre *Zygosaccharomyces* Barker :

Asques précédés d'une copulation, ascospores à membrane lisse.

La levure 13 a des cellules présentant des formes apiculées.

Il résulte des recherches de Klöcker que les levures apiculées constituent un groupe de levures très différentes, dont les formes appartiennent au type apiculé.

Klöcker en a décrit plusieurs nouvelles espèces, les unes sporulent et appartiennent au genre *Hansenia*, les autres ne sporulent pas et sont groupées dans le genre *Pseudosaccharomyces*.

La levure 13 ne sporulant pas, doit être rangée dans le genre *Pseudosaccharomyces* Klöcker.

IV. - Description des espèces

SACCHAROMYCES N° 1

Cellules elliptiques ou ovoïdes, dimensions moyennes $8 \times 6 \mu$. Dans la végétation de dépôt, les cellules rondes sont les plus abondantes, elles sont accompagnées de cellules pastoriennes, on y trouve quelques cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en stries a ses bords presque lisses. La face postérieure est lisse, elle est de couleur blanche.

La colonie géante est blanche, le cratère bien développé; l'intérieur en est gaufré par des plis irréguliers. Du cratère partent des plis circulaires ne dépassant pas le tiers de la couronne. Ces plis sont recoupés par des gouttières radiaires donnant à la surface un aspect plissé. Le bord de la colonie est finement festonné.

La partie inférieure est plane avec de nombreux petits mamelons disposés concentriquement.

Moût. — Cultivée sur moût de poires, cette levure ne forme pas de voile, mais un anneau continu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Elle sporule facilement sur moût gélatiné, sur moût gélosé, sur plâtre. La température maxim. de sporulation est comprise entre 33° et 34° , la température optim. est de 25° . La température minim. de $2-3^{\circ}$. Une ou deux spores par asque. Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont : 15-16° et 3°.

FERMENTATION. — Elle fait fermenter les glucose, levulose, galactose, saccharose, maltose (pas le lactose, pas le raffinose). La température optimum de fermentation est de 29°; la température mortelle (1) est supérieure à 60°. Cette levure supporte très bien une acidité atteignant 30 grs d'acide malique.

SACCHAROMYCES N° 2

Cellules ovoïdes ou elliptiques (dimensions moyennes 8×6 μ), entremêlées de quelques cellules pastoriennes. Dans la végétation de dépôt, les cellules pastoriennes sont peu nombreuses. On n'y trouve pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, à bords légèrement échancrés, la face postérieure en est lisse; elle ne pousse pas dans la gélatine en profondeur. Sillon médian peu accusé.

La colonie géante est blanche, des dépressions la divisent en lobes. La face inférieure est plane mais présente des protubérances qui s'enfoncent dans la gélatine.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires cette levure donne un anneau continu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Sur gélatine au moût, on ne trouve que quelques cellules sporulées avec une, deux, trois spores par asque. Sur moût gélifié, nous n'avons pas trouvé de spores. Sur plâtre, la température maxim. de sporulation est de 36-37°. La température optim. est comprise entre 18-30°. La température minim. est de 8-9°. Les spores *ne sont pas acido-résistantes*. La sporulation de cette levure se distingue nettement de celle des autres levures de poiré par ses températures limites et par la non acido-résistance des spores.

(1) La température mortelle donnée dans la description des espèces est celle obtenue avec l'eau de levure contenant 30 % de glucose et ayant une acidité de 2 gr. 27 en acide malique.

Les températures limites de bourgeonnement sont : 45-46° et 3°.

FERMENTATION. — Cette levure fait fermenter les glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose; pas le lactose; le raffinose est fermenté pour un tiers. Elle résiste à la température de 60°.

La température optimum de fermentation est comprise entre 29 et 33°.

SACCHAROMYCES N° 3

Levures à cellules ovoïdes elliptiques ou rondes. Les plus grandes ont $10 \times 7 \mu$; les plus nombreuses $7 \times 5 \mu$. La végétation de dépôt contient des cellules pastoriennes parfois disposées en chapelets, mais pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, à bords lisses, pileux. La face postérieure est pileuse et pénètre légèrement dans la gélatine.

La colonie géante est blanche, peu surélevée, le cratère est peu développé, il en part de nombreux plis radiaires qui sont plus fins et plus serrés à la périphérie.

La face inférieure présente des protubérances, la colonie s'enfonce très fortement en cupule dans la gélatine.

Moût. — Cultivée sur moût de poirés, cette levure donne des îlots de voile et un anneau interrompu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût, une, deux, trois spores par asque.

Sur plâtre, la température maxim. de sporulation est de 33-34°, la température optim. de 25°, la température minim. de 0-3°. Les ascospores se fusionnent au moment de germer.

Les températures limites de bourgeonnement sont : 38-39° et 0-2°.

FERMENTATION. — Cette levure fait fermenter les sucres suivants : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose; elle ne fait pas fermenter le lactose. La température optimum de fermentation est de 29°. Elle résiste à la température de 60°.

SACCHAROMYCES N° 4

Levure de formes bien homogènes. Cellules elliptiques ou ovoïdes. Dimensions moyennes $8 \times 5 \mu$.

La végétation de dépôt ne contient pas de cellules sporulées, il y a quelques cellules pastoriennes.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, à bords crénelés, la surface est légèrement mamelonnée. Face postérieure lisse, la gélatine n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours.

La colonie géante est blanche, cratère très développé, l'intérieur en est lisse. Du cratère partent des plis circulaires qui gagnent le bord de la colonie.

Ces plis circulaires sont recoupés par des plis radiaux. Les abords du cratère ont un aspect gaufré: Le pourtour de la colonie est finement festonné.

Moût. — Sur moût de poires, il se forme des îlots de voile et un anneau discontinu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Cette levure sporule facilement sur moût gélatiné et sur moût gélosé. Une, deux, trois spores par asque. Sur plâtre, les températures limites de sporulation sont 36-37° et 6-7°. La température optimum 25°. Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont : 45-46° et 3°.

FERMENTATION. — Cette levure fait fermenter le glucose, le lévulose, la galactose, le saccharose, le maltose, le raffinose pour un tiers de son poids, elle ne fait pas fermenter le lactose. Elle résiste à la température de 60°.

La température optimum de fermentation est de 33°.

Elle supporte bien les milieux ayant une forte acidité. Le départ de la fermentation a lieu au bout de 93 h. à 16-17° dans l'eau de levure sucrée contenant 30 grs d'acide malique par litre.

Avec un moût enrichi en sucre dosant 240 grs de sucres réducteurs, cette levure a pu produire 12 % d'alcool en volume.

SACCHAROMYCES N° 5

Cellules elliptiques ou ovoïdes, les moyennes ont $7 \times 6 \mu$, les plus grandes peuvent atteindre $10 \times 7 \mu$.

Dans la végétation de dépôt on trouve quelques cellules sporulées et un petit nombre de cellules pastoriennes.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche à bords dentelés, rainure médiane. La face postérieure est pileuse et pénètre dans la gélatine. La colonie géante est blanche. L'intérieur du cratère est lisse. Du cratère partent des plis se digitant à la périphérie. Le pourtour de la colonie est finement denté. Celle-ci s'enfonce profondément en cupule dans la gélatine, on trouve de nombreuses protubérances à la face inférieure.

Moût. — Sur moût de poires cette levure ne donne pas de voile, mais seulement un anneau discontinu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Elle sporule sur moût gélatiné et sur moût gélosé. Une, deux, trois spores par asque.

Sur plâtre, les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sont (31-32°), 25-5°.

Les températures limites de bourgeonnement sont : 38-39° et 0-2°.

FERMENTATION. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose; le lactose ne fermente pas avec cette levure.

La température optimum de fermentation est de 29°. La température mortelle est comprise entre 55° et 60°.

SACCHAROMYCES N° 6

Cette levure a des cellules elliptiques ovoïdes ou rondes pouvant atteindre de grandes dimensions ($13 \times 9 \mu$). Les plus petites ont $5 \times 4 \mu$, les moyennes $8 \times 6 \mu$. A côté de ces cellules on trouve des cellules pastoriennes pouvant atteindre $20 \times 4 \mu$. La végétation de dépôt est formée de cellules d'aspect homogène; on n'en trouve pas de sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche à bords lobés, la surface en est mamelonnée. Elle croît en hauteur. Sa face inférieure est pileuse et pénètre dans la gélatine.

La colonie géante est blanche.

Du cratère partent de nombreuses gouttières donnant un aspect plissé à la colonie.

Le pourtour est finement denté.

La colonie s'enfonce en cupule dans la gélatine.

Moût. — Sur moût cette levure ne donne pas de voile, il se forme un anneau interrompu.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. Il y a une, trois, mais le plus souvent, quatre spores par asque. Sur plâtre, les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sont (31-32°), 25° et (0-3°). On constate une conjugaison des ascospores au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont (38-39°) et (0-2°).

FERMENTATION. — Cette levure fait fermenter : le glucose, le lévulose, le galactose, le saccharose, le maltose, le raffinose, pas le lactose. Elle résiste à la température de 60°. La température optimum de fermentation est de 29°.

SACCHAROMYCES N° 7

Cellules elliptiques ou rondes, dimensions moyennes $6 \times 4 \mu$, entremêlées de quelques cellules pastoriennes pouvant atteindre $20 \times 4 \mu$.

Dans la végétation de dépôt on trouve des cellules pastoriennes disposées en chapelets; il n'y a pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche avec une large rainure médiane; les bords en sont dentelés, la face postérieure est pileuse et pénètre dans la gélatine.

La colonie géante est blanche, le cratère est peu accusé avec des protubérances verruqueuses à l'intérieur.

Il en part des plis profonds divisant la surface en larges lobes. Le pourtour de la colonie est très finement denté. Elle s'enfonce profondément dans la gélatine, la face inférieure présente des protubérances.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, elle ne donne ni voile, ni anneau.

SPORULATION-BOURGEONNEMENT. — Elle sporule facilement sur moût gélatiné et sur moût gélosé. Une, deux, trois quatre spores par asque. Sur plâtre, la température maximum de sporulation est comprise entre 31 et 32° . La température optimum est de 25° . La température minimum $0-3^{\circ}$.

Les températures limites de bourgeonnement sont : $38-39^{\circ}$ et 3° .

FERMENTATION. — Cette levure fait fermenter : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose. Elle résiste à la température de 60° . La température optimum de fermentation est de 29° .

SACCHAROMYCES N° 8

Levure à grandes cellules elliptiques (les plus nombreuses mesurant $9 \times 6 \mu$) d'aspect homogène.

La végétation de dépôt est constituée par de grandes et de petites cellules elliptiques. Un certain nombre de grandes cellules sont sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, à bords lisses, pileux. Un léger chevelu pénètre dans la gélatine à la face inférieure. La gélatine n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours.

La colonie géante est en forme de cône surbaissé. Le cratère est circulaire, l'intérieur en est ponctué. La surface de la colonie est finement plissée par des plis radiaires, le pourtour en est circulaire.

La face inférieure porte des protubérances. La colonie s'enfonce profondément dans la gélatine.

Moût. — Cultivée dans du moût de poires, elle donne un anneau peu développé; il n'y a pas de voile.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule sur gélatine et gélose au moût. On trouve 1, 2, 3, 4 spores par asque. Les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sur plâtre sont ($33-34^\circ$), 18° et ($3-5^\circ$). Les ascospores se conjugent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont ($38-39^\circ$) 3° .

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29° . Cette levure supporte une température voisine de 60° .

SACCHAROMYCES N° 9

Cellules elliptiques de dimensions variables, les petites ont $6 \times 4 \mu$; les grandes $10 \times 7 \mu$.

La végétation de dépôt est formée par des cellules de petite taille de formes et de dimensions bien homogènes. Il n'y a pas de cellules pastoriennes, ni de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie ressemble à celle de la levure 8, la gélatine n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours.

La colonie géante ressemble également à celle de la levure 8.

Moût. — Sur moût de poires cette levure ne donne qu'un anneau insignifiant.

Sporulation-Bourgeonnement. — Elle sporule facilement sur moût gélatiné et sur moût gélosé. 1, 2, 3, 4 spores par asque. Sur plâtre les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sont : (33-34°), 30°, 5°. On constate une conjugaison des ascospores au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont : (38-39°), (0-2°).

Fermentation. — Cette levure fait fermenter : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose. Elle résiste à un chauffage atteignant 60°.

La température optimum de fermentation est de 29°.

SACCHAROMYCES N° 10

Cellules elliptiques ou ovoïdes de dimensions allant de $5 \times 4 \mu$ à $7 \times 5 \mu$.

La végétation de dépôt est constituée par des cellules d'aspect bien homogène, quelques-unes sont sporulées. Il n'y a pas de cellules pastoriennes.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, elle présente une rainure médiane, le bord est finement denté, presque lisse, pileux. La face postérieure est pileuse et pénètre dans la gélatine. La colonie géante ressemble à celle de la levure 8, mais le cratère est plus développé, son intérieur est lisse. Le pourtour est très

finement dentelé. La colonie s'enfonce en cupule dans la gélatine.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, elle ne donne ni voile ni anneau.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule facilement sur gélatine et gélose au moût, 1, 2, 3, 4 spores par asque. Les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sur plâtre sont : (36-37°), 25°, 5°. Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont : (38-39°), 3°.

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°. Elle résiste à un chauffage atteignant 60°.

SACCHAROMYCES N° 11

Cellules elliptiques de $7 \times 5 \mu$ accompagnées de cellules pastoriennes pouvant atteindre $22 \times 4 \mu$.

La végétation de dépôt est formée de cellules elliptiques d'aspect homogène, les cellules pastoriennes sont peu abondantes, on y trouve des cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est formée de grosses colonies rondes confluentes; elle présente une rainure médiane, des bords festonnés. La face inférieure porte un chevelu s'enfonçant dans la gélatine.

La colonie géante ressemble à celle de la levure 8. Elle s'enfonce en cupule dans la gélatine.

Moût. — Cultivée dans du moût de poires, elle ne donne qu'un anneau très peu développé.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule facilement sur moût gélatiné et moût gélosé. 1, 2, 3, 4 spores par asque. Sur plâtre la température maximum de sporulation est de 33-34°; la température optimum est de 25°. La température minimum de 6-7°.

Les températures limites de bourgeonnement sont : (38-39°) (0-2°).

Fermentation. — Cette levure fait fermenter : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°. Elle résiste à un chauffage atteignant 60°.

SACCHAROMYCES N° 12

Levure à grandes cellules elliptiques pouvant atteindre $14 \times 10 \mu$ accompagnées de cellules plus petites ayant $7 \times 5 \mu$.

La végétation de dépôt est constituée de cellules elliptiques ou rondes d'aspect bien homogène.

On y trouve quelques cellules sporulées, il n'y a pas de cellules pastoriennes.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est blanche avec une large rainure médiane, les bords en sont lisses, pileux, la face inférieure est velue.

La colonie géante ressemble à celle de la levure 7. La face inférieure présente des protubérances. La culture s'enfonce profondément dans la gélatine.

Moût. — La culture sur moût de poires ne donne qu'un anneau peu perceptible.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. 1, 2, 3, 4 spores par asque. Les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sur plâtre sont : (33-34°) (18-25°) et (0-3°). Il y a conjugaison des ascospores au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont : (42-43°), 3°.

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est comprise entre 25 et 29°.

Cette levure résiste à un chauffage atteignant 60°.

PSEUDOSACCHAROMYCES N° 13

Cellules apiculées ou ovoïdes. Dimensions moyennes $7 \times 5 \mu$; les plus grandes ont $10 \times 8 \mu$.

La végétation de dépôt présente environ 50 % de cellules apiculées.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est mince, légèrement transparente, de couleur blanc sale, à bords lisses, croissant en surface. La face inférieure est plane. La colonie géante est blanche. Il n'y a pas de cratère, la partie centrale est légèrement surélevée à contour irrégulier. Le tiers externe de la colonie est très finement plissé, le pourtour est circulaire.

La partie centrale est creusée de quelques dépressions lui donnant un aspect moutonné.

Moût. — Sur moût de poires cette levure forme un anneau; il n'y a pas de voile.

Sporulation-Bourgeonnement. — Tous les essais de sporulation sur gélatine et gélose au moût et sur gélose farhydre ont été négatifs. Cette levure apiculée ne semble pas sporuler et appartient au genre *Pseudosaccharomyces* Klöcker.

Les températures limites de bourgeonnement sont : (29-32°) (0-2°).

Fermentation. — Elle fait fermenter seulement le glucose et le lévulose.

La température optimum de fermentation est de 33°. La température mortelle est comprise entre 51 et 55°. Cette levure supporte bien les milieux ayant une forte acidité. Le départ de la fermentation a lieu au bout de 93 heures à 16-17° dans l'eau de levure sucrée contenant 30 grs d'acide malique par litre.

Le maximum d'alcool produit est de 5°2.

SACCHAROMYCES N° 14

Cellules ovoïdes et elliptiques de dimensions très variables allant de $4 \times 2 \mu$ à $14 \times 10 \mu$.

Dans la végétation de dépôt on trouve quelques rares cellules pastoriennes; il n'y a pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, à bords dentés, la face inférieure est duveteuse et pénètre à l'intérieur de la gélatine.

La colonie géante ressemble à celle de la levure 7, mais les lobes sont plus nombreux et plus profondément découpés.

La colonie s'enfonce en cupule dans la gélatine.

Moût. — La culture sur moût de poires ne donne sur le vase qu'un semblant d'anneau à la surface de séparation.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule facilement sur gélatine au moût et gélose au moût. 1, 2, 3, 4 spores par asque. Sur plâtre la température maximum de sporulation est de $33-34^{\circ}$. La température optimum de 25° ; la température minimum de 5° .

Les températures limites de bourgeonnement sont : ($38-39^{\circ}$), 3° .

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 21° .

La température mortelle est comprise entre 55 et 60° .

SACCHAROMYCES N° 15

Très belles cellules elliptiques bien homogènes dans les dimensions; celles-ci sont de $8 \times 6 \mu$.

La végétation de dépôt renferme des cellules pastoriennes généralement isolées, il n'y a pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine*. — La culture en strie est blanche, elle présente une rainure médiane, les bords en sont

lisses, la face inférieure duveteuse croît à l'intérieur de la gélatine.

La colonie géante est blanche, le cratère peu proéminent, l'intérieur en est ponctué. Du cratère partent des gouttières radiaires donnant à la surface de la colonie un aspect finement plissé.

Le pourtour est finement denté. La colonie s'enfonce dans la gélatine par de nombreuses protubérances.

Moût. — Cette levure ensemencée sur moût de poires donne un anneau peu perceptible.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. 1, 2, 3, 4 spores par asque.

Les températures maxim., optim. et minim. de sporulation sur plâtre sont (33-34°), 25°, 3°. Les températures limites de bourgeonnement sont (38-39°) 3°.

Fermentation. — Cette levure fait fermenter: glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°. La température mortelle est comprise entre 56 et 60°. Elle est assez sensible à l'acidité des milieux de culture. Le départ de la fermentation n'a lieu qu'au bout de 194 heures à 16-17°, dans l'eau de levure sucrée contenant 30 grs d'acide malique par litre.

SACCHAROMYCES N° 16

Cellules elliptiques parfois ovoïdes de dimensions allant de $9 \times 6 \mu$ à $12 \times 8 \mu$.

La végétation de dépôt contient un petit nombre de cellules pastoriennes et quelques cellules sporulées.

CULTURES. — Gélatine. — La culture en strie est blanche, à bords presque lisses, légèrement sinueux, pileux. Sillon médian. La face inférieure est duveteuse et pénètre dans la gélatine.

La colonie géante est blanche, le cratère peu proémi-

ment. La surface de la colonie est nettement plissée, des plis plus profonds la divisent en lobes peu accusés.

Moût de poires. — Il y a formation d'un anneau de 1 mm d'épaisseur sur les parois du vase.

Sporulation, bourgeonnement. — Cette levure sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. Sur plâtre, la température maximum de sporulation est de 33-34°. La température optimum de 25; la température minimum de 5°. 1, 2, 3, 4 spores par asque. Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont (38-39°-3°).

Fermentation. — Les sucres fermentés sont: glucose, lévulose, galactose, maltose, saccharose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°.

Cette levure résiste à un chauffage atteignant 60°.

ZYGOSACCHAROMYCES N° 17

Cette levure a des cellules elliptiques ou ovoïdes, d'aspect homogène, mesurant $7 \times 5 \mu$.

La végétation de dépôt contient un certain nombre de cellules qui, après bourgeonnement, restent réunies par groupes de deux ou trois, formant parfois des associations rameuses. On n'y observe pas de phénomène de copulation.

CULTURES. — Gélatine. — La culture en strie est blanche, elle présente une rainure médiane, les bords sont sinueux; la face inférieure plane. Elle liquéfie rapidement la gélatine (en 18 jours à 18°).

La colonie géante est d'un blanc cireux, le cratère est large, peu profond, ponctué.

La surface présente des plis circulaires peu accentués, recoupés par des plis radiaires dont les plus profonds délimitent des lobes.

L'ensemble de la colonie est peu surélevé, le bord en

est lobé. La face inférieure est plane et ne pénètre pas dans la gélatine. Celle-ci n'était pas liquéfiée au bout de 100 jours.

Moût. — Cultivée dans du moût de poires, cette levure forme un anneau net sur les parois du vase.

Sexualité-sporulation. — Elle ne sporule pas sur plâtre, mais la sporulation a lieu sur gélose au moût, sur carotte.

L'asque résulte de la copulation isogamique rarement hétérogamique de deux cellules. On trouve également des asques parthénogénétiques renfermant 1 ou 2 spores, principalement dans les cultures sur gélose. On trouve, deux, trois, quatre spores dans les deux renflements résultant de la copulation de deux cellules. La germination des ascospores se fait par bourgeonnement normal sans qu'il y ait rupture de la paroi de l'asque. Cette levure appartient donc au genre *Zygosaccharomyces*.

Fermentation. — Cette levure ne fait fermenter que le glucose et le lévulose. La température optimum de fermentation est comprise entre 29° et 33°. Elle résiste à un chauffage atteignant 60°. Elle est sensible à l'acidité. Elle ne fait plus fermenter l'eau de levure sucrée lorsqu'elle renferme plus de 12 grs d'acide malique par litre.

Le maximum d'alcool produit est de 5°2.

SACCHAROMYCES N° 18

Cellules elliptiques ayant en moyenne $18 \times 5 \mu$, mais pouvant atteindre $10 \times 6 \mu$, présentant des petits bourgeons en des points quelconques de la périphérie. Ces bourgeons doivent se séparer rapidement, car on trouve beaucoup de petites cellules à côté des cellules adultes.

La végétation de dépôt renferme des cellules pastoriennes et des cellules sporulées, principalement dans les cellules pastoriennes.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie porte une

mince rainure médiane, elle croît en surface, les bords sont lisses, la face inférieure, plane, ne pénètre pas dans la gélatine.

La colonie géante ressemble à celle de la levure I, mais les bords du cratère sont moins nets. La partie inférieure est plane, avec de petites protubérances disposées circulairement dans la partie située sous les bords du cratère.

Moût de poires. — Il ne se forme ni voile, ni anneau.

Sporulation-Bourgeonnement. — Cette levure sporule sur gélatine et gélose au moût. Généralement, deux spores par asque ; quelquefois une ou trois. Sur plâtre, les températures maximum, optimum et minimum de sporulation sont : 38°, 25°, 5°. Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement sont (45-46°), 3°.

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, pas le lactose. Le raffinose est fermenté pour la moitié de son poids.

La température optimum de fermentation est comprise entre 29 et 33°.

Cette levure résiste à un chauffage atteignant 60°.

SACCHAROMYCES N° 19

Cellules elliptiques ou ovoïdes, dimensions moyennes $7 \times 5 \mu$, les plus grosses atteignent $9 \times 6 \mu$.

Dans la végétation de dépôt on trouve des cellules pastoriennes, mais pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est blanche à bords lisses. Elle croît en surface, la face inférieure est plane. La gélatine n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours.

La colonie géante ressemble à celles des levures 1 et 18.

La surface inférieure est plane et ne pénètre pas dans

la gélatine. Celle-ci n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, elle donne lieu à la formation d'îlots de voile et d'un anneau discontinu sur les parois du vase.

Sporulation-Bourgeonnement. — Nous n'avons pas trouvé de spores dans la culture en strie sur gélatine au bout de 28 jours.

Par contre, cette levure sporule sur gélose au moût, une ou deux spores par asque, le plus souvent une.

Les températures maximum, optimum et minimum de sporulation sur plâtre sont (31-32°), 25°, (6-7°).

Les températures limites de bourgeonnement : (45-46°), 3°.

Fermentation. — Les sucres fermentés sont : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, pas le lactose.

Le raffinose est fermenté pour la moitié de son poids. La température optimum de fermentation est comprise entre 30 et 33°.

Cette levure résiste à un chauffage atteignant 60°.

SACCHAROMYCES N° 20

Cellules de formes hétéroclites, elliptiques, ovoïdes, en biscuit, de dimensions variables présentant dans leur intérieur de nombreux corpuscules réfringents. Dimensions moyennes : $8 \times 6 \mu$...

La végétation de dépôt présente des cellules pastoriennes. On trouve des spores dans quelques-unes de ces cellules..

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est blanche, à bords légèrement sinueux; elle croît en surface, la face inférieure est plane.

La colonie géante ressemble à celles des levures 1, 18, 19.

La partie inférieure présente de petites protubérances

disposées concentriquement et pénétrant dans la gélatine.

Moût de poires. — Cette levure donne un important îlot de voile au centre de la surface libre du liquide, ainsi qu'un anneau discontinu..

Sporulation, bougeonnement. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. Le plus souvent une ou deux spores par asque, quelquefois 4. Sur plâtre, les températures maximum, optimum et minimum de sporulation sont (36-37°), 25°, (0-3°). Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bougeonnement sont : (45-46°), 3°.

Fermentation. — Cette levure fait fermenter : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, pas le lactose, ni le raffinose. Elle résiste à la température de 60°. La température optimum de fermentation est comprise entre 30° et 33°.

Elle supporte bien les milieux ayant une forte acidité. Le départ de la fermentation a lieu au bout de 93 heures à 16-17° dans l'eau de levure sucrée contenant 30 grs d'acide malique par litre.

SACCHAROMYCES N° 21

Cellules elliptiques ou rondes de dimensions très variables allant de $6 \times 5 \mu$ à $10 \times 9 \mu$.

Dans la végétation de dépôt, les cellules sont rassemblées par paquets.. On ne trouve pas de cellules pastoriennes, il n'y a pas de spores.

CULTURES. — Gélatine. — La culture en strie est blanche, plissée transversalement, formée d'îlots confluent, rainure médiane, bords festonnés. La face inférieure est plane.

La gélatine n'est pas liquéfiée au bout de 100 jours. La colonie géante est blanche, peu surélevée; la dépression du cratère est peu profonde. De la base du cratère par-

tent des gouttières rayonnantes recoupées par un pli circulaire près de la périphérie. Pourtour circulaire finement denté.

La colonie s'enfonce en cupule dans la gélatine.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, cette levure donne un anneau continu, mais pas de voile.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle sporule difficilement. Sur plâtre, sporulation au bout de 25 jours à 30°5, pas de sporulation aux autres températures. Sur carotte, les cellules sporulées sont peu nombreuses. On trouve généralement une spore pas asque, quelquefois deux, rarement quatre.

Température optimum de sporulation 25°. Les températures limites de bourgeonnement sont : (38-39°), 3°.

Fermentation. — Cette levure fait fermenter: glucose, lévulose, galactose, saccharose, raffinose, mais pas le maltose, ni le lactose.

La température optimum de fermentation est de 25°. La température mortelle est comprise entre 51 et 55°.

SACCHAROMYCES N° 22

Cellules de petites dimensions allant de $4 \times 3 \mu$ à $6 \times 6 \mu$, souvent réunies par deux.

La végétation de dépôt est formée de cellules de dimensions variables; un certain nombre d'entre elles restent accolées après bourgeonnement et semblent se fusionner. Le même fait a été observé dans des cultures sur carottes âgées de 35 jours (Planche XI).

La végétation de dépôt ne contient que quelques rares cellules pastoriennes; il n'y a pas de spores.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est semblable à celle de la levure 21. Au bout de 100 jours, la gélatine n'est pas liquéfiée.

La colonie géante ressemble à celle de la levure 21.

Moût de poires. — Cette levure donne un anneau net, mais pas de voile.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle ne sporule pas sur plâtre; elle sporule sur gélose au moût, sur carotte; généralement une spore par asque, plus rarement deux.

Température optimum de sporulation: 25°. Les températures limites de bourgeonnement sont: (38-39°), 3°.

Fermentation. — Cette levure fait fermenter: glucose, lévulose, galactose, saccharose, raffinose, mais *pas le maltose*, ni le lactose.

La température optimum de fermentation est de 25°. La température mortelle est comprise entre 56 et 60°. Cette levure ressemble beaucoup à la levure 21. Elle s'en distingue par les dimensions des cellules qui sont plus grandes, la température mortelle qui est plus élevée.

SACCHAROMYCES N° 23

Cellules ovoïdes ou elliptiques ayant en moyenne $8 \times 6 \mu$ et pouvant atteindre $10 \times 7 \mu$, accompagnées de cellules pastoriennes pouvant mesurer jusqu'à $22 \times 4 \mu$, disposées en chapelets ou ayant un aspect arborescent.

La végétation de dépôt contient des cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est blanche, formée de petits îlots confluents, les bords sont dentés, velus. La face inférieure très pileuse s'enfonce dans la gélatine.

La colonie géante est blanche. Cratère large, peu profond. Il en part de fines gouttières se digitant à la périphérie, plissant la surface.

Les bords présentent de fines arborisations. La colonie est peu surélevée.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, cette levure donne un anneau peu perceptible.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle sporule sur gélatine et gélose au moût. Deux, trois, quatre spores par asque.

Sur plâtre, les températures maximum, optimum et minimum de sporulation sont : (31-32°), 25°, (0-3°).

Les températures limites de bourgeonnement : (38-39°), 3°.

Fermentation. — Les sucres fermentés sont: glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°. Cette levure résiste à un chauffage atteignant 60°. Elle est la plus sensible à l'action de l'acidité de toutes les levures de poiré que nous avons étudiées, exception faite pour le *Zygosaccharomyces*. Le départ de la fermentation n'a lieu qu'au bout de 236 heures à 16-17° dans l'eau de levure sucrée contenant 15 grs d'acide malique par litre.

SACCHAROMYCES N° 24

Cellules elliptiques ou ovoïdes, dimensions moyennes: $8 \times 6 \mu$, entremêlées de cellules pastoriennes, disposées en chapelets. Cette levure ressemble beaucoup morphologiquement à la levure 23.

La végétation de dépôt ne contient pas de cellules sporulées.

CULTURES. — *Gélatine.* — La culture en strie est blanche, sa surface est ponctuée par de nombreux îlots, les bords sont lobés, la culture s'enfonce en brosse dans la gélatine.

La colonie géante ressemble à celles des levures: 1, 18, 19.

Elle présente à sa surface inférieure de nombreuses protubérances et s'enfonce profondément dans la gélatine.

Moût de poires. — Cette levure forme un anneau très mince et interrompu.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. Sur plâtre, la température maximum de formation des ascospores est de 31-32°. La température optimum de 25°; la température minimum de (2-4°). Deux, trois, quatre spores par asque.

Les températures limites de bourgeonnement sont: (38-39°), 3°.

Fermentation. — Cette levure fait fermenter: glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, raffinose, pas le lactose.

La température optimum de fermentation est de 29°. La température mortelle est comprise entre 56 et 60°.

SACCHAROMYCES N° 25

Cellules elliptiques ou rondes ayant comme dimensions moyennes $8 \times 6 \mu$ accompagnées de quelques cellules pastoriennes.

La végétation de dépôt contient des cellules sporulées.

CULTURES. — Gélatine. — La culture en strie est blanche avec une large rainure médiane; les bords sont lisses, la face inférieure pileuse.

La colonie géante est blanche, le cratère est peu accusé. La surface est plissée, le pourtour est finement découpé. La face inférieure porte des protubérances.

Moût. — Ensemencée dans du moût de poires, cette levure donne un anneau discontinu. Il n'y a pas formation de voile.

Sporulation, bourgeonnement. — Elle sporule facilement sur gélatine et gélose au moût. Une, deux, trois, quatre spores par asque. Sur plâtre, les températures maxim., optim. et minim. de formation des ascospores sont: (31-32°), 25° (6-7°). Les ascospores se conjuguent au moment de la germination.

Les températures limites de bourgeonnement : (38-39°), (0-2°).

Fermentation. — Cette levure fait fermenter: glucose, lévulose, galactose, saccharose, raffinose, pas le lactose. Elle résiste à la température de 60°.

La température optimum de fermentation est de 29°.

V. - Etude complémentaire de la fermentation

Nous avons déjà, dans l'étude des caractères physiologiques, déterminé pour chacune des levures isolées, la température optimum de fermentation, nous avons également recherché comment se comportaient ces levures dans des moûts enrichis en sucre.

Dans ce deuxième chapitre nous avons étudié plus spécialement:

Le coefficient d'utilisation du sucre;

L'acidité produite au cours de la fermentation. — Et pour nous rendre compte de l'utilisation possible de ces levures dans l'industrie, en vue de la production de l'alcool neutre, nous avons fait des essais portant sur:

a) *La fermentation des moûts de poires dilués, analogues à ceux utilisés dans l'industrie;*

b) *La fermentation produite par une levure unique ou l'association de deux levures.*

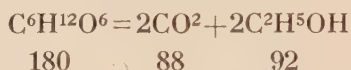
Nous avons étudié *l'influence de l'aliment azoté sur la vitesse de fermentation et la production de l'alcool;*

L'action des sels de cuivre et de manganèse sur la fermentation.

Pouvoir alcooligène Coefficient d'utilisation du sucre

Ce coefficient est le rapport entre la quantité de sucre disparue et la quantité d'alcool produit, exprimée en volume %. Il représente le poids de sucre en grammes par litre que la levure consomme pour donner 1° d'alcool.

D'après la formule de Gay-Lussac :



100 grs de glucose ou de lévulose donneraient théoriquement 51 grs 11 d'alcool et il faudrait 15 à 16 grs de sucre pour produire 1° d'alcool, ou 1 gr de sucre serait capable de fournir 0 cm³ 64 d'alcool.

Mais la fermentation est plus complexe que ne l'indique cette formule. Une partie du sucre est transformée en glycérine, acide succinique et autres produits accessoires, ainsi que l'a montré Pasteur (C. R. A. S. 46-857-1858 et 47-224-1858). Ce savant n'a obtenu avec la fermentation de 100 grs de saccharose que 51 grs 1 d'alcool; pour 100 grs de glucose on n'aurait que 48 grs 6 d'alcool, soit 61 cm³ 1. Il faudra compter sur environ 16 grs 4 de sucre pour obtenir 1° d'alcool.

Pour la détermination de ce coefficient, nous avons utilisé :

1° *Du moût de poires* contenant 88 grs de sucre interverti par litre et ayant une acidité de 1 grs 32 par litre exprimée en SO⁴H²;

2° *Du moût de pommes* renfermant 103 grs 5 de sucre par litre et ayant une acidité de 2 grs 6.

Ces deux moûts ont été additionnés de 1 % de phosphate d'ammoniaque (afin que l'aliment azoté ne fasse pas défaut aux levures), puis répartis à raison de 250 cm³ dans des flacons munis de tubes fermentateurs. Les flacons ont été placés à l'étuve électrique réglée à 23°.

Les dosages de l'alcool produit et du sucre restant ont été faits au bout de 25 jours pour le moût de poires et de

21 jours pour le moût de pommes. La fermentation était alors terminée.

L'alcool a été dosé à l'aide de l'alcoomètre au 1/5 de degré après distillation, le sucre par la méthode de G. Bertrand.

Dans l'essai comportant l'utilisation du moût de pommes on a ajouté un flaconensemencé avec de la levure de grain utilisée en distillerie, de façon à pouvoir étudier cette dernière comparativement avec les levures de poires.

Nos résultats ne peuvent être identiques à ceux obtenus dans la pratique industrielle où l'on opère avec des moûts non stériles. Lévy (62) indique qu'il faut compter dans la pratique un rendement maximum de 57 litres d'alcool rectifié pour 100 kilogs de sucre interverti, soit environ 17 grs 55 de sucre pour obtenir 1° d'alcool.

Néanmoins, les chiffres du tableau XI permettent de comparer entre elles les diverses levures de poires, au point de vue de l'utilisation du sucre.

Dans nos essais le coefficient d'utilisation du sucre s'est trouvé plus faible avec le moût de pommes qu'avec le moût de poires, donc le rendement en alcool des jus de poires semblerait inférieur à celui des jus de pommes.

La levure apiculée (13) et le *Zygosaccharomyces* (17) n'ont fait fermenter que partiellement le moût de pommes; leur coefficient d'utilisation est élevé.

Les levures 12, 18, 21 paraissent les plus intéressantes au point de vue de la transformation du sucre.

Elles produisent: 1° d'alcool avec moins de 17 grs de sucre aussi bien dans la fermentation du moût de poires que dans celle du moût de pommes. La levure de grain a un coefficient d'utilisation un peu plus élevé que celui des meilleures levures de poires.

Il a fallu de 16 grs 93 à 19 grs 38 de sucre, pour obtenir 1° d'alcool avec le moût de poires; de 16 grs 3 à 20 grs 27 avec le moût de pommes.

TABLEAU XI
Coefficient d'utilisation du sucre

LEVURES	MOUT DE POMMES 103 gr. 5 de sucre par litre			MOUT DE POIRES 88 gr. 5 de sucre par litre		
	alcool en volume %	sucre restant en grammes par litre	coefficient d' utilisation du sucre	alcool en volume %	sucre restant en grammes par litre	coefficient d' utilisation du sucre
1	4,8	1,25	18,0	5,4	2,9	18,62
2	5,0	1,45	17,32	5,3	3,1	18,94
3	4,8	1,70	17,87	5,3	4,0	18,77
4	5,0	1,25	17,35	6,0	4,4	16,51
5	4,5	1,50	19,22	5,3	3,35	18,9
6	5,0	1,40	17,32	6,0	2,5	16,38
7	5,0	1,40	17,32	6,1	2,9	16,5
8	4,8	1,55	18,01	6,0	3,8	16,61
9	4,1	1,55	18,34	6,1	3,4	16,4
10	4,8	1,55	18,00	6,0	5,0	16,41
11	4,9	1,45	17,66	6,1	3,1	16,45
12	5,1	1,45	16,93	6,1	4,1	16,3
13	4,4	1,40	19,68	3,3	36,6	20,27
14	5,0	1,50	17,30	6,1	3,5	16,4
15	5,0	1,40	17,32	6,1	2,7	16,52
16	4,7	1,10	18,50	6,0	4,35	16,52
17	4,9	1,55	17,65	4,7	11,75	19,5
18	5,1	1,40	16,98	6,0	3,0	16,75
19	4,5	1,15	19,30	5,8	2,65	17,4
20	4,9	1,45	17,66	5,8	3,0	17,32
21	5,1	1,60	16,93	6,1	2,95	16,48
22	4,6	1,40	18,70	5,9	2,6	17,1
23	4,8	1,55	18,11	6,0	2,3	16,86
24	5	1,45	17,31	6,1	2,9	16,5
25	4,7	1,30	18,44	6,0	4,9	16,43
grain				6,0	2,9	16,76

Acidité produite au cours de la fermentation

La levure modifie l'acidité du milieu au cours de la fermentation. Elle augmente l'acidité du moût et cela d'autant plus qu'il est primitivement moins acide, ainsi que l'a montré Fernbach (20).

Dans un même milieu les modifications de l'acidité varient avec la race de levure et avec le temps.

Du moût de poires renfermant 94 grs de sucre, ayant une acidité totale de 5 grs 5 exprimée en SO_4H^2 et une acidité volatile de 0 gr. 11 en acide acétique, a été réparti à raison de 250 cm^3 dans des flacons munis de tubes fermentateurs.

Après ensèmençement avec les différentes levures de poires, les flacons ont été abandonnés à la température du laboratoire. On a dosé au bout de 30 jours:

1° L'acidité totale sur 5 cm^3 , d'après la méthode utilisée à la station pomologique de Caen (Warcollier) (11), p. 429;

2° L'acidité volatile d'après la méthode de Duclaux et le mode opératoire indiqué par Gayon (21), en opérant sur 40 cm^3 de liquide fermenté.

La levure 13 (apiculée) est celle dont le liquide fermenté présente la plus forte acidité totale: 3 grs 9, et la plus forte acidité volatile: 2 grs 3.

Puis vient la levure 4 avec 6 grs 9 d'acidité totale et 0 grs 98 d'acidité volatile.

Les levures qui ont produit le moins d'acidité totale sont les levures 23, 17 et 25.

Il est à remarquer que les levures qui produisent le plus d'acidité sont celles qui sont les moins sensibles à l'influence de l'acide et inversement celles qui en produisent le moins sont les plus sensibles à cette influence.

TABLEAU XII

LEVURES	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2	ACIDITÉ VOLATILE EN $\text{CH}^3\text{CO}^2\text{H}$	LEVURES	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2	ACIDITÉ VOLATILE EN $\text{CH}^3\text{CO}^2\text{H}$
	GRAMMES	GRAMMES		GRAMMES	GRAMMES
1	6,6	0,30	14	6,3	0,21
2	6,7	0,50	15	6,7	0,21
3	6,5	0,25	16	6,4	0,50
4	6,9	0,98	17	6,6	0,21
5	6,4	0,30	18	6,7	0,30
6	6,6	0,30	19	6,7	0,34
7	6,7	0,34	20	6,7	0,30
8	6,3	0,30	21	6,4	0,43
9	6,5	0,26	22	6,4	0,26
10	6,5	0,21	23	6,4	0,26
11	6,5	0,21	24	6,4	0,21
12	6,4	0,26	25	6,2	0,30
13	8,9	2,30			

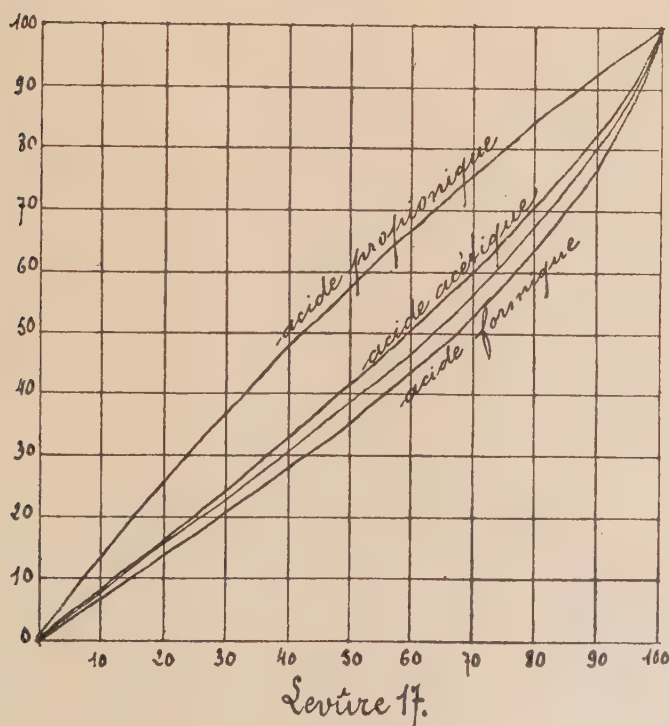
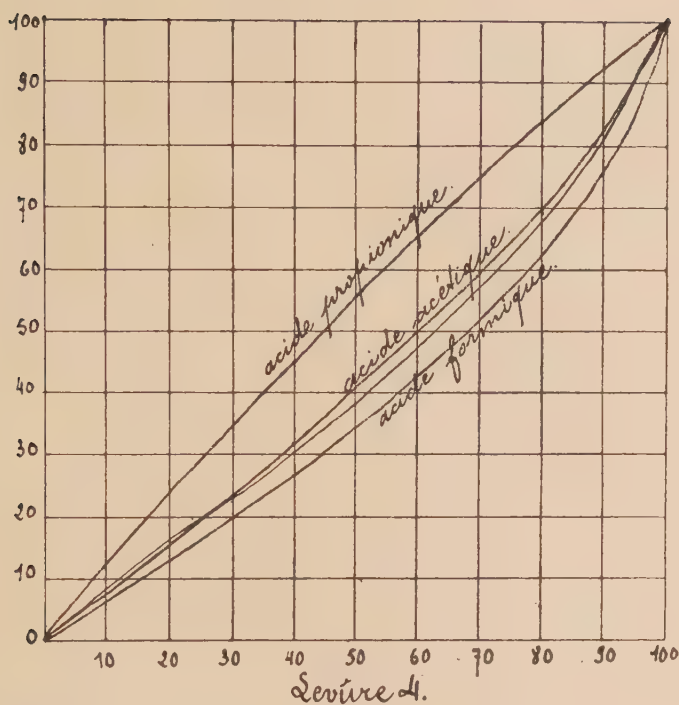
NATURE DE L'ACIDITÉ VOLATILE

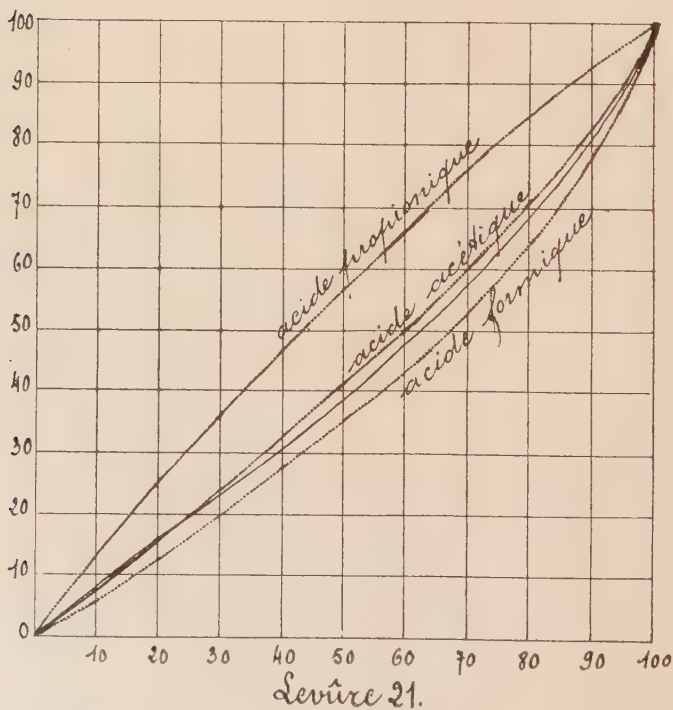
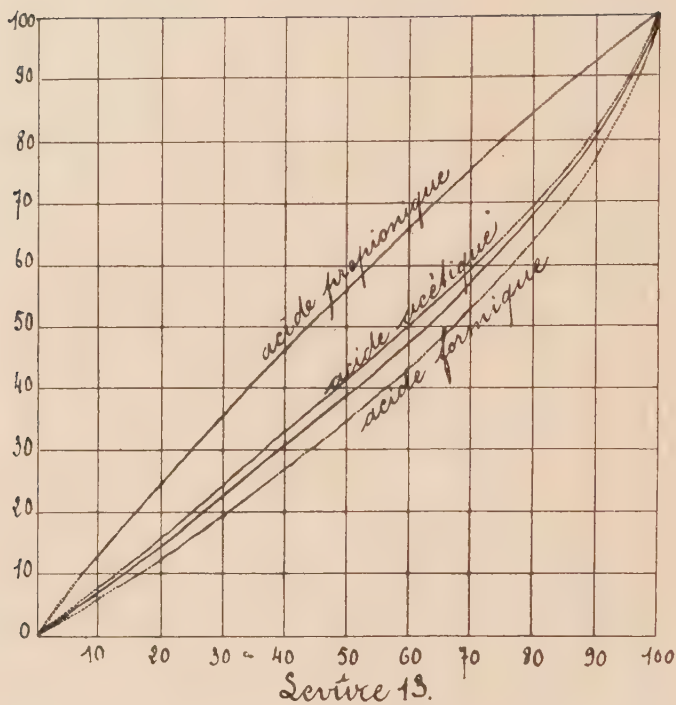
110 cm³ de liquide fermenté ont été introduits dans un ballon puis neutralisés avec une solution de soude normale, jusqu'à réaction franchement alcaline, et distillés jusqu'à réduction au tiers environ du volume primitif, de façon à débarrasser le liquide des produits volatils autres que les acides volatils.

Celui-ci, une fois refroidi, a été acidifié avec une solution d'acide tartrique 2 N (150 grs par litre), de façon à libérer les acides volatils et à permettre leur distillation dans la seconde partie de l'opération.

Le liquide ramené à 110 cm³ a été distillé à nouveau de façon à déterminer la nature de l'acidité volatile par la méthode de Duclaux (13).

Des prises successives de 10 cm³ ont été opérées. L'acidité de ces prises a été déterminée au moyen de l'eau de chaux en se servant de la phénolphtaléine comme indicateur.





Les courbes de distillation fractionnée obtenues avec les différentes levures de poires sont situées entre les courbes types établies par Duclaux pour l'acide acétique et l'acide formique.

Elles se rapprochent beaucoup plus de la courbe de l'acide acétique pur, que de la courbe de l'acide formique pur.

On peut donc en conclure que l'acide volatil élaboré est constitué principalement par de l'acide acétique mélangé d'un peu d'acide formique.

Cependant, pour la levure 17 (*Zygosaccharomyces*) les proportions d'acide acétique et d'acide formique élaborées sont à peu près équivalentes.

Fermentation de Moût de poires dilué et additionné de sulfate d'ammoniaque

Les moûts de poires et de pommes mis en fermentation en distillerie sont amenés à une densité comprise entre 1.030 et 1.033 et additionnés de 1 0/00 d'azote à l'état de sulfate d'ammoniaque soit environ 5 0/00 de ce sel. La température des jus est maintenue entre 28 et 30°. (Nous avons déjà vu que la température de 29° est la température optimum de fermentation de la plupart des levures de poires que nous avons étudiées).

L'essai ci-après a été fait de façon à pouvoir suivre la disparition progressive du sucre et à établir, pour chacune des levures de poires, la courbe de fermentation.

Pour cela, du moût de poires de Blanchard a été dilué avec de l'eau et amené à la densité de 1.032. On l'a additionné de 2 grs par litre de sulfate d'ammoniaque et réparti à raison de 150 cm³ dans de grands tubes à fond rond, mesurant 380 mm. de longueur sur 35 mm. de diamètre.

Dans chaque tube a été introduit un mustimètre; après avoir bouché au coton, on a stérilisé une heure à la vapeur fluente.

Les tubes ont étéensemencés à la pipette avec 1 cm³ 5 de culture liquide âgée de 22 jours.

Un tube témoin n'a pas étéensemencé.

Tous les tubes ont été placés à l'étuve électrique réglée à 29°.

La densité a été relevée toutes les six heures et même toutes les trois heures durant la période où la disparition du sucre était particulièrement rapide.

La lecture des indications fournies par les densimètres a été assez aisée, sauf pour la levure 1 où une abondante production de mousse l'a rendue parfois difficile.

Les mustimètres sont des instruments qui ne sauraient donner des indications précises sur la teneur en sucre des jus en fermentation, mais, lorsqu'il s'agit d'établir des courbes de densité, ils sont particulièrement intéressants, en permettant de faire des mesures très rapides, lorsqu'on a de nombreux échantillons en fermentation.

Nous avons consigné dans le tableau XIII les densités trouvées jusqu'à la 162^e heure.

L'examen de ce tableau montre que la diminution de la densité n'a lieu qu'à partir de la 24^e heure, pour quelques levures à partir de la 12^e heure.

Avec les bonnes levures de poires, la chute est très rapide entre la 24^e et la 54^e heures, puis, l'abaissement de la densité devient très faible.

Au bout de 168 heures la plus faible densité observée a été 1.006.

L'examen des densités est particulièrement intéressant au bout de 60 heures. Alors que la densité varie entre 1.007 et 1.010 avec les levures donnant une atténuation rapide, elle est de:

1.027 pour le *Zygosaccharomyces*;

1.022 pour l'apiculée;

1.024 pour la levure 21;

1.023 pour la levure 22.

TABLEAU XIII

Fermentation du moût de poire de densité 1.032

Lèvres	TEMPS EN HEURES															Alcool % en volume
	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	78	102	162		
	Densité															
1	1032	1032	1032	1032	1031	1030	1029	1024	1020	1016	1014	1011	1010	1010	2,5	
2	32	32	32	32	31	30	24	19	15	12	10	0,8	0,8	0,7	2,5	
3	32	32	32	32	32	30	24	20	15	11	0,8	0,8	0,7	0,7	2,5	
4	32	32	32	32	30	28	24	19	15	10	10	0,9	0,9	0,7	2,5	
5	32	32	32	32	31	28	24	19	14	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	2,4	
6	32	31	32	32	31	27	27	21	17	14	11	0,8	0,8	0,7	2,4	
7	32	32	32	32	31	25	25	21	15	15	13	10	10	0,8	2,4	
8	32	32	32	32	31	29	24	20	16	12	10	0,7	0,9	0,8	2,4	
9	32	32	31	31	31	30	24	18	14	10	0,8	0,8	0,8	0,7	2,4	
10	32	32	32	32	31	30	24	20	15	10	10	0,8	0,7	0,7	2,4	
11	32	32	32	32	31	30	27	21	17	11	0,9	0,8	0,8	0,8	2,3	
12	32	32	32	32	31	30	28	25	21	17	13	0,9	0,8	0,8	2,6	
13	32	32	31	31	30	29	27	26	25	24	22	18	13	0,9	2,3	
14	32	32	31	31	31	28	24	20	16	13	11	0,8	0,8	0,8	2,5	
15	32	32	32	32	31	30	26	22	17	10	0,8	0,8	0,8	0,8	2,3	
16	32	32	32	31	31	29	24	17	10	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	2,3	
17	32	32	32	31	31	31	20	14	21	27	27	25	21	18	2	
18	32	32	32	31	31	28	26	22	18	16	12	10	0,8	0,9	2,5	
19	32	32	31	31	31	28	25	20	15	12	0,7	0,7	0,7	0,6	2,5	
20	32	32	31	31	30	28	25	21	19	16	12	0,8	0,7	0,6	2,5	
21	32	32	32	32	31	30	29	28	27	25	22	17	14	0,6	2,5	
22	32	32	32	32	32	31	30	29	27	25	20	13	0,8	0,7	2,4	
23	32	32	32	32	31	30	25	21	16	13	10	0,8	0,8	0,8	2,4	
24	32	32	32	32	31	28	24	20	15	12	0,8	0,8	0,7	0,7	2,5	
25	32	32	31	31	30	27	22	23	11	0,11	0,1	0,8	0,7	0,7	2,4	

Ces levures qui se sont montrées très différentes des autres au point de vue morphologique, s'en distinguent encore ici, au point de vue vitesse de fermentation.

Rapprochons ces résultats de ceux de la pratique industrielle.

En distillerie, la durée de la fermentation est très courte: 56 à 74 heures; la chute de la densité donne une courbe presque verticale. On arrive à faire tomber la densité aux environs de 1.002. Mais cela tient à la façon dont s'opère la fermentation. Celle-ci se pratique par la méthode dite de coupage. On fait couler le moût dans des cuves où se trouve déjà du jus en pleine fermentation, par conséquent sur un milieu de culture en pleine activité.

La fermentation se déclare immédiatement et la première partie de la courbe est supprimée.

Néanmoins cet essai nous a permis de classer nos levures de poires, d'après la rapidité avec laquelle elles font disparaître le sucre, ce qui peut donner d'utiles indications au point de vue de leur utilisation pratique.

Le dosage de l'alcool a été fait le 9^e jour. Les titres alcooliques sont en moyenne de 2°4 à 2°5.

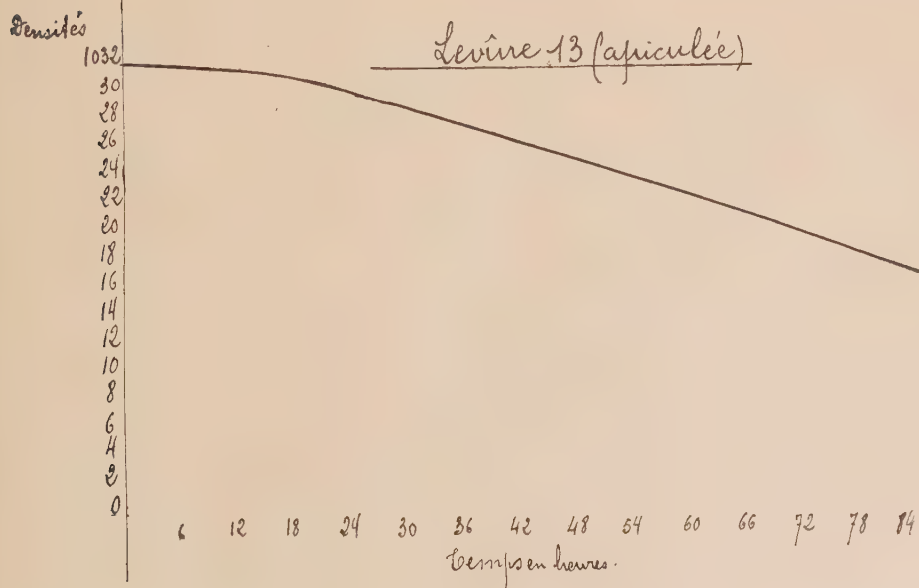
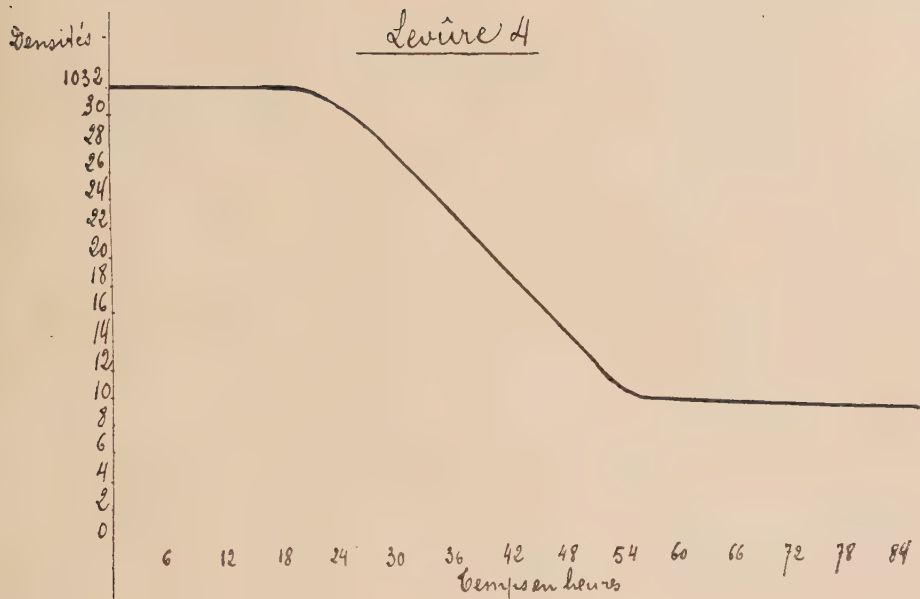
Nous avons reproduit la courbe de fermentation d'une bonne levure de poires (levure 4) et celle d'une mauvaise levure de poires (levure 13, apiculée).

On remarque que pour cette dernière la chute de densité est très lente, et la courbe presque rectiligne.

Levures combinées

Nos essais de fermentation ont été faits jusqu'alors, avec des moûts stériles.

Il était intéressant d'étudier la façon dont se comporteraient les levures de poiresensemencées, soit seules, soit associées par deux, dans des moûts non privés des organismes qu'ils contiennent naturellement.



Nous avons fait pour cela deux séries d'essais en utilisant :

1° *Du moût de poires de densité 1.048, additionné de 1 0/00 de phosphate biammonique pur;*

2° *Le même moût amené à la densité de 1.032 et également additionné de 1 0/00 de phosphate d'ammoniaque.*

Chaque série a comporté un certain nombre de flacons de 1 litre contenant 800 cm³ de moût décanté, après défécation dans une pièce froide.

On a ajouté dans chaque flacon 45 cm³ de moût stérilisé en pleine fermentation, la fermentation ayant été obtenue par inoculation d'une ou deux levures pures.

Le moût de densité 1.048 a été abandonné à la température du laboratoire (18°).

Le moût dilué a été placé dans une étuve électrique réglée à 29°.

Tous les flacons ont été munis de tubes fermentateurs de façon à diminuer les pertes d'alcool par évaporation à travers les bouchons de coton.

Le premier essai a comporté l'étude des levures suivantes: Levures naturelles des fruits, levure de grain, levures 1, 4, 17, 19, 20, 21 et en combinaison les levures (4+19), (4+20), (1+20).

Le moût employé était celui de densité 1048.

Le deuxième essai a été fait avec le moût de densité 1032 inoculé avec des levures naturelles en pleine fermentation, avec les levures simples 4, 19, 20 et les levures combinées (4+24), (4+25).

Le dosage des produits de fermentation a été fait au bout de un mois et demi pour le premier essai; de un mois pour le deuxième.

Les résultats trouvés sont consignés dans les tableaux XIV et XIV bis.

La composition du moût utilisé était la suivante:

Sucre total	92 grs 5
Sucre réducteur	86 grs 6
Acidité totale en SO ⁴ H ² .	5 grs 6

Celle du moût dilué :

Sucre total 60 grs
 Sucre réducteur 56 grs
 Acidité totale en SO^4H^2 . 3 grs 8

L'examen de ces tableaux montre: *que les levures naturelles existant dans le moût se sont montrées inférieures aux levures pures.*

C'est la levure 4 qui, parmi les levures simples, a donné la plus forte quantité d'alcool.

La levure de grain se comporte à peu près comme les bonnes levures de poires.

Les levures combinées ont donné un rendement en alcool inférieur à celui des levures simples entrant dans le mélange, pour le moût non dilué, supérieur avec le moût dilué.

TABLEAU XIV

Moût non dilué			
LEVURE	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2
Lev. natur.	4°5	2 gr. 3	6 gr. 4
Lev. grain	5°	3 gr. 1	6 gr. 2
1	5°	2 gr. 5	6 gr. 6
4	5°2	2 gr. 7	6 gr. 9
17	4°7	3 gr. 9	6 gr. 6
19	5°	2 gr. 6	6 gr. 4
20	5°	2 gr. 4	6 gr. 4
21	4°8	2 gr. 5	7 gr.
4+19	4°8	2 gr. 6	6 gr. 8
4+20	4°7	3 gr. 3	7 gr.
1+20	4°8	2 gr. 8	6 gr. 6

TABLEAU XIV bis

Moût dilué			
LEVURE	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2
Lev. natur.	3°1	3 gr.	4 gr. 9
Lev. grain	3°3	2 gr.	4 gr. 8
4	3°3	2 gr.	5 gr. 2
19	3°2	2 gr. 4	4 gr. 9
20	3°3	2 gr. 1	4 gr. 9
4+19	3°4	2 gr.	5 gr.
4+20	3°4	2 gr. 1	4 gr. 9

**Nutrition azotée de la levure ;
son rôle dans les fermentations obtenues
avec les levures de poires**

D'après Warcollier, les moûts de pommes renferment en moyenne 100 mmgrs d'azote par litre dont la moitié environ est assimilable par la levure (111), p. 404.

Cette pauvreté en azote explique pourquoi la fermentation du cidre est très lente. Il est même des cas où, avec des moûts très pauvres en azote, comme ceux de la pomme Mettais, les levures ne peuvent transformer la totalité du sucre et les cidres obtenus restent naturellement doux.

Les moûts de poires sont également pauvres en azote.

(Nous avons trouvé 72 et 86 mmgrs d'azote total dans deux analyses de jus de poires).

Quand on soumet les moûts de poires et de pommes à la stérilisation, une partie de l'azote se précipite, devient inassimilable et certaines races de levures refusent de s'y développer, Kayser (42).

Nous avons été à même de vérifier ce fait d'une façon tout à fait fortuite.

Un moût de poires provenant de fruits récoltés en 1929 avait été stérilisé et conservé dans des flacons de deux litres.

Sa teneur en azote total était alors de 72 mmgrs par litre.

Une certaine quantité de ce moût fut répartie dans des flacons de 125 cm³, *restérilisée* etensemencée avec les 25 levures de poiré que nous avons isolées.

Pas un de ces flacons ne fut le siège d'une fermentation.

Le moût restant fut additionné de 1 0/00 de phosphate d'ammoniaque, réparti dans des petits flacons etensemencé avec les levures précédentes. Tous les flacons entrèrent en fermentation. Il est donc nécessaire, si l'on

veut avoir des fermentations, à la fois complètes et rapides, d'apporter à la levure l'aliment azoté qu'elle trouve en trop faible quantité, dans les moûts de poires et de pommes.

Nous avons vu qu'en distillerie on ajoutait aux jus envoyés à la fermentation, soit du sulfate d'ammoniaque, soit du phosphate d'ammoniaque. Pour Lévy (62) l'addition de sulfate d'ammoniaque est particulièrement recommandable.

« Ce sel a pour effet d'augmenter la dose d'azote du moût et en même temps d'empêcher la formation trop grande d'alcool amylique, laquelle peut provenir de l'alimentation des levures aux dépens des albuminoïdes. Il en résulte que le moût additionné d'ammoniaque fermentera plus vite et ne risquera pas de fournir à la distillation de l'acétate d'amyle, qui a un goût de poires peu recherché.

Le sulfate d'ammoniaque a sur les levures naturelles de la pomme un effet sélectif important. Lorsqu'on laisse fermenter du jus de pommes naturel par des levures spontanées, la fermentation est longue et ne se termine pas. La raison en est que les levures apiculées sont les premières à partir, gênant les autres levures qui ne pourront terminer la fermentation. Si on met dans le moût du sulfate d'ammoniaque, cela donne la prépondérance aux levures du type *Saccharomyces*, au détriment des apiculées; la fermentation ira jusqu'au bout. »

La production de l'alcool amylique et des huiles de fusel est, ainsi que le signale Lévy, sous la dépendance de l'alimentation azotée mise à la disposition de la levure.

Ces huiles de fusel se forment surtout en fin de fermentation; elles constituent les produits de queue et diminuent le rendement en alcool bon goût. Elles sont constituées principalement d'alcool amylique, d'alcool isoamylique et, en proportions moindres, d'alcool propylique et d'alcool isobutylique.

La production de ces huiles intéresse au plus haut point les producteurs d'alcool.

Les conditions de leur formation ont fait l'objet de travaux fort intéressants de la part d'Ehrlich et de Pringsheim.

Ehrlich (18), p. 1027, a montré que la levure ne s'assimile les composés amidés, comme aliments azotés, que lorsqu'elle les a désagrégés en deux parts :

Une première, qu'elle rejette et qui constitue les alcools supérieurs et c'est là l'origine des huiles de fusel; une autre qu'elle s'assimile; l'ammoniaque qui est son aliment azoté de prédilection. Cette ammoniaque est, par ce phénomène vital, transformée dans la suite en azote albuminoïde.

Au point de vue pratique, ainsi se trouvent indiqués les moyens d'obtenir un minimum ou un maximum d'huile de fusel.

Pringsheim (92), p. 121 et 286, après avoir étudié les relations de la quantité d'azote que l'on expérimente avec la levure considérée comme végétal ou comme ferment, conclut que si l'on augmente artificiellement la richesse en azote d'un moût naturel, les levures ensemencées faiblement ou largement, à la disposition desquelles on aura mis de la peptone, de l'asparagine, du sulfate d'ammoniaque, donneront une fermentation où l'on peut réduire fortement (plus de moitié) la production du fusel » (Cité par Bottu (7), p. 57).

La production de l'alcool étant en relations étroites avec la nutrition azotée, nous avons recherché, avec les levures de poires, quelle pouvait être l'action de l'aliment azoté ajouté au moût :

1° *Sur la rapidité de la fermentation;*

2° *Sur la quantité d'alcool produit.*

Premier essai. — Cet essai a été fait en vue de déterminer la quantité de phosphate d'ammoniaque agissant

le plus favorablement sur la rapidité de la fermentation.

Pour cela, nous nous sommes servi, d'abord, d'un milieu minéral, puis d'un moût de poires.

Comme milieu minéral, nous avons adopté celui utilisé par Bottu pour son étude sur la nutrition azotée de la levure, en le modifiant légèrement.

MILIEU DE BOTTU

Phosphate bipotassique.	4 gr.
Sulfate de magnésium...	0 gr. 50
Sulf. de calcium anhydre	0 gr. 25
Tartrate acide de K.....	0 gr. 50
Saccharose cristallisé ...	200 gr.
Glucose pur	5 gr.
Eau distillée	Q. s. pour 1000 cm ³

MILIEU UTILISÉ

Phosphate bipotassique.	4 gr.
Sulfate de magnésium...	0 gr. 50
Sulf. de calcium anhydre	0 gr. 20
Acide malique	1 gr.
Saccharose.....	160 gr.
Eau distillée	Q. s. pour 1000 cm ³

Ce milieu a été réparti à raison de 250 cm³ dans deux séries de quatre flacons.

Pour chaque série les quantités de phosphate biammonique ajoutées ont été:

Flacon N° 1	0 grs 75 0/00
Flacon N° 2	1 gr 0/00
Flacon N° 3	1 gr 5 0/00
Flacon N° 4	2 grs 0/00

(Le phosphate a été ajouté à l'état de solution).

La première série a étéensemencée à la pipette avec la levure 4; le deuxième avec la levure 19.

Les flacons ont été munis de tubes fermentateurs et placés à l'étuve à 23°.

Nous avons noté le départ de la fermentation.

Celui-ci a été beaucoup plus long pour les flacons ensemencés avec la levure 4, cette levure s'accomodant, probablement, moins facilement du milieu minéral que la levure 19.

Au bout de 26 jours, on a dosé l'alcool formé.

TABLEAU XV
Milieu Minéral

LEVURE	PHOSPHATE D'AM. AJOUTÉ EN GR. PAR LITRE	TEMPS NÉCESS. AU DÉPART DE LA FERMENTATION	ALCOOL FORMÉ EN VOLUME %
4	0,75	9 jours	2°6
4	1	7 —	3°8
4	1,5	7 —	3°2
4	2	8 —	3°2
19	0,75	88 heures	3°2
19	1	67 —	3°5
19	1,5	69 —	5°1
19	2	93 —	3°

L'examen du tableau démontre que:

1° *C'est avec les doses de 1 gr. et 1 gr. 5 de phosphate d'ammoniaque que le temps nécessaire au départ de la fermentation est le plus court;*

2° *Pour la levure 4, c'est la dose de 1 gr. qui a donné la fermentation la plus avancée avec 3°8 d'alcool; pour la levure 19, c'est la dose de 1 gr. 5 qui s'est montrée la plus favorable.*

On a refait le même essai en employant du moût de poires dosant:

93 grs 8 de sucre total;

5 grs 70 d'acidité totale en SO^4H^2

0 gr. 072 d'azote total.

Le dosage de l'azote dans les moûts est assez délicat, nous avons opéré d'après les indications qui nous ont été aimablement communiquées par M. Ferré, directeur de la Station oenologique de Beaune.

Verser dans un matras 50 cm³ de jus, rendre légèrement acide par de l'acide sulfurique et évaporer dans le vide le plus possible. Ajouter ensuite 20 cm³ d'acide sulfurique pur, 10 grs environ de bisulfate de potasse, 2 grs environ de mercure ou de sulfate de cuivre et chauffer comme on fait pour un Kjeldahl ordinaire en bien veillant pour éviter la mousse. Celle-ci tombée, continuer à chauffer. Si la masse charbonneuse ne se détruit pas,

ajouter à nouveau de l'acide sulfurique, 10 cm³ environ, et chauffer jusqu'à obtention d'un liquide incolore. Pour la suite suivre la méthode Kjeldahl.

Le dosage de l'alcool a été fait au bout de douze jours.

Les flacons avaient été laissés à la température du laboratoire.

TABLEAU XVI
Moult de Poires

LEVURE	PHOSPHATE D'AM. AJOUTÉ EN GR. PAR LITRE	ALCOOL FORMÉ EN VOLUME %
4	témoin	2,4
4	0,75	2,5
4	1	2,8
4	1,5	4,1
4	2	3,4
19	témoin	2
19	0,75	2,2
19	1	2,4
19	1,5	3,2
19	2	2,8

C'est la dose de 1 gr. 5 de phosphate d'ammoniaque qui s'est montrée la plus favorable pour les deux levures.

On peut donc considérer, d'après ces essais, que pour les levures de poires, *ce sont les doses de 1 gr. à 1 gr. 5 de phosphate d'ammoniaque qui agissent le plus favorablement sur la rapidité de la fermentation.*

Deuxième essai. — Nous avons ensuite essayé l'action comparative du phosphate, du sulfate, du chlorure, du nitrate, du citrate d'ammonium, en prenant des quantités de sel correspondant à l'azote contenu dans 1 gr. 5 de phosphate d'ammonium, soit, pour :

Le phosphate d'am.	1 gr. 5
Le sulfate d'am.	1 gr. 5
Le nitrate d'am.	1 gr. 815
Le chlorure d'am.	1 gr. 215
Le citrate d'am.	2 gr. 565

Nous nous sommes d'abord servi du milieu minéral comme milieu nutritif. Celui-ci a étéensemencé avec les

levures 4 et 19. Le dosage de l'alcool fait au bout de 14 jours a donné les résultats suivants:

TABLEAU XVII

SEL AMMONIACAL	LEVURE 4 ALCOOL % EN VOLUME	LEVURE 19 ALCOOL % EN VOLUME
Sulfate. . . .	3,8	5,2
Phosphate . .	3,1	3,8
Chlorure. . . .	3,8	4,8
Citrate. . . .	4,4	5,6

Il manque les résultats du nitrate, les flacons ayant reçu ce sel s'étant trouvés infectés.

L'examen de la production de l'alcool montre que c'est le citrate qui donne la fermentation la plus rapide, le phosphate la plus lente.

L'essai a été refait dans les mêmes conditions, mais en utilisant du moût de poires dosant:

100 grs de sucres totaux

1 gr. 65 d'acidité totale en SO^4H^2

0 gr. 086 d'azote total

L'alcool a été dosé au bout de 34 jours, c'est-à-dire, *lorsque la fermentation a été terminée*, de façon à déterminer l'influence des sels ammoniacaux ajoutés, sur la production de l'alcool.

TABLEAU XVIII

LEVURE	SEL AMMONIACAL	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2
4	témoin. . . .	4°9	4 gr. 1	2 gr. 5
4	sulfate. . . .	5°2	2 gr. 5	2 gr. 25
4	phosphate . .	5°3	2 gr. 6	2 gr. 95
4	chlorure . . .	5°	2 gr. 3	2 gr. 15
4	nitrate	5°	2 gr. 2	2 gr. 35
4	citrate. . . .	5°	2 gr. 1	3 gr. 5
19	témoin. . . .	4°8	4 gr. 2	2 gr. 35
19	sulfate. . . .	5°2	2 gr. 2	2 gr. 55
19	phosphate . .	5°1	2 gr. 5	2 gr. 75
19	chlorure . . .	5°	2 gr. 4	2 gr. 15
19	nitrate	5°3	2 gr. 1	2 gr. 40
19	citrate. . . .	4°8	2 gr.	3 gr. 9

De l'examen du tableau XVIII, il ressort que:

Le citrate qui avait donné la fermentation la plus rapide se montre ici comme étant le sel le moins favorable au point de vue rendement en alcool;

Le chlorure est aussi peu favorable;

Les phosphate, sulfate et nitrate d'ammonium semblent avoir une action à peu près équivalente sur la production de l'alcool;

C'est le moût citaté qui a donné l'acidité totale la plus forte.

Comparons ces résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs avec des levures de vin et de cidre.

Bottu, avec deux levures de Champagneensemencées dans du moût additionné de doses croissantes de phosphate d'ammonium (0 gr. 5, 1 gr. 5, 2 grs, 6 grs par litre), constate que pour ces deux levures, la quantité d'azote favorablement assimilée est voisine de 0 gr. 200 0/00, ce qui correspond à 1 0/00 de *phosphate d'ammonium*.

Dans un autre essai, Bottu, à l'aide de son milieu minéral et de l'une des levures précédentes, a étudié l'influence des divers sels ammoniacaux sur la fermentation. Il a expérimenté les sels suivants: sulfate, phosphate, azotate, chlorure, aspartate, succinate, tartrate, citrate, en utilisant des doses de sel correspondant à l'azote contenu dans 2 grs de phosphate d'ammonium pour 1.000 cm³.

Il arrive aux conclusions suivantes:

Les sels minéraux donnent des fermentations beaucoup plus lentes et moins spontanées que les sels organiques. Le citrate et le tartrate, en particulier, favorisent la multiplication de la levure. L'aspartate a donné la meilleure fermentation, le phosphate et le chlorure sont presque aussi favorables, mais l'action de ce dernier sel est loin d'être la même avec les autres levures; puis, viennent le succinate et l'azotate.

Le citrate est le sel ammoniacal le moins apprécié par la levure dans ces conditions.

Kayser (42), p. 101, en étudiant l'influence de l'aliment

azoté sur la production des éthers et en utilisant un moût de pommes additionné, soit de phosphate d'ammoniaque, soit de sulfate d'ammoniaque, à teneur d'azote égale, a obtenu les quantités d'alcool suivantes:

LEVURE 153		LEVURE 153 + LEVURE 158 (apiculée)	
Moût sulfaté	Moût phosphaté	Moût sulfaté	Moût phosphaté
6° 6	6° 3	6° 9	6° 4

Le sulfate a donné un rendement en alcool supérieur à celui du phosphate avec la levure 153, égal avec la combinaison 153+158.

Nous pouvons conclure à la suite des essais que nous avons effectués qu'avec les levures de poires:

1° *La vitesse de fermentation a son maximum, pour une dose de phosphate d'ammonium ajouté, comprise entre 1 gr. et 1,5 pour 1.000 cm³;*

2° *Que des sels utilisés: sulfate, phosphate, chlorure, nitrate, citrate, c'est le sel organique qui a donné la fermentation la plus rapide; le phosphate la plus lente;*

3° *Qu'au point de vue alcool produit, des cinq sels essayés: sulfate, phosphate, chlorure, nitrate, citrate, c'est l'addition de citrate qui donne la plus faible teneur en alcool, puis celle de chlorure. Le sulfate, le phosphate et le nitrate semblent s'équivaloir au point de vue de leur action, sur la production de l'alcool.*

Action des sels de cuivre et de manganèse

I. — SELS DE CUIVRE.

De l'action des sels de cuivre sur la fermentation, c'est l'action du sulfate qui a été la mieux étudiée, ce sel se trouvant introduit dans les moûts de raisin, à la suite des traitements anticryptogamiques.

Ce corps peut agir comme excitant ou comme retardateur, suivant les doses ajoutées au moût. Krüger (Cen-

tralbl. f. Bakt 1895 T I, p. 10), donne le chiffre de 0 gr. 09 0/00 comme limite de la dose excitante.

Kayser (40), p. 96, dans une étude sur l'influence des agents physiques et chimiques sur les levures, mentionne que si l'on ensemence une levure dans un moût sulfaté, on peut constater quelquefois un retard dans le départ de la fermentation, mais que celle-ci reprend plus activement, d'une façon variable, d'ailleurs, avec la race de levure et que les dilutions de 1/4000 à 1/600.000 seraient plutôt stimulantes.

Bottu (7), à l'aide de levures de Champagne, a constaté une action favorable sur la production de l'alcool avec une dose de 0 gr. 150 par litre, défavorable avec une dose de 0 gr. 025.

Nous avons recherché quelle pouvait être l'action des sels de cuivre sur les fermentations produites par les levures de poires.

Dans un premier essai, nous avons étudié l'action de doses croissantes de sulfate de cuivre sur la production de l'alcool.

Pour cela, nous nous sommes servi du milieu minéral utilisé pour la nutrition azotée, en lui ajoutant l'aliment azoté qui lui manquait, sous forme de 1 gr. de sulfate d'ammoniaque par litre.

Deux séries de flacons contenant:

250 cm³ de milieu minéral ont reçu des doses croissantes de sulfate de cuivre. Ce sel a été ajouté à l'état dissous à des doses correspondant par litre de milieu nutritif à:

0 gr. 15 pour le flacon N° 1

0 gr. 10 pour le flacon N° 2

0 gr. 05 pour le flacon N° 3

0 gr. 02 pour le flacon N° 4

0 gr. 01 pour le flacon N° 5

Le flacon témoin N° 6 n'a pas reçu de cuivre.

La première série de flacons a été ensemencée avec la levure 2, la deuxième avec la levure 4.

Le dosage de l'alcool a été fait au bout de 30 jours pour les flacons de la première série; au bout de 24 jours pour ceux de la deuxième série.

DOSES DE SO^4CU PAR LITRE	LEVURE 2 ALCOOL % EN VOLUME	LEVURE 4 ALCOOL % EN VOLUME
témoin	6°8	3°2
0 gr. 01	4°8	3°1
0 gr. 02	7°6	3°2
0 gr. 05	3°4	4°4
0 gr. 10	0°8	2°2
0 gr. 15	0°2	1°

La dose de 0,02 0/00 s'est montrée favorable pour la levure 2, celle de 0,05 0/00 pour la levure 4, les autres doses ont retardé la fermentation.

Deuxième essai. — Celui-ci a porté sur l'action des trois sels: sulfate, bimalate et acétate de cuivre. Nous avons utilisé cette fois un moût de poires contenant 94 grs de sucre par litre, et ayant une acidité totale de 4 grs 7 exprimée en SO^4H^2 .

Les quantités de sels ajoutées par litre ont été celles correspondant au cuivre contenu dans 0 gr. 02 de sulfate de cuivre.

Faute de moût, l'essai n'a pu être fait qu'avec une seule levure, la levure 2.

Le dosage de l'alcool a été fait au bout de 16 jours, la fermentation étant à peu près terminée (les flacons ayant été maintenus à la température de 25°).

SELS DE CUIVRE	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT	ACIDITÉ TOTALE EN SO^4H^2
témoin. . . .	4°8	4 gr. 4	5 gr. 6
bimalate . . .	5°	4 gr. 5	6 gr.
sulfate. . . .	4°9	5 gr. 6	5 gr. 2
acétate. . . .	4°8	5 gr. 7	5 gr. 3

Des trois sels essayés, c'est le bimalate qui a agi le plus favorablement sur la production de l'alcool, l'acétate n'a produit aucun effet.

De l'ensemble de ces essais, il résulte que l'addition de sels de cuivre (sulfate, bimalate) est susceptible d'augmenter sensiblement le rendement en alcool des moûts ensemençés avec les levures de poires.

Les quantités de sulfate de cuivre qui se sont montrées les plus favorables sont comprises entre 0 gr. 02 et 0 gr. 05 0/00.

L'action du bimalate semble un peu supérieure à celle du sulfate.

II. — SELS DE MANGANÈSE

L'influence des sels de manganèse sur la fermentation alcoolique a été étudiée par Kayser et Marchand (44).

Ces auteurs ont constaté que lorsqu'on additionne un moût sucré d'un sel de manganèse, on remarque que la fermentation se déclare d'autant plus lentement que la quantité de sel employée est plus forte, mais qu'elle se termine sensiblement au même moment.

D'autre part, la fermentation est poussée beaucoup plus loin; il y a une augmentation d'alcool, quelquefois très sensible, variable suivant la levure employée; il en est de même pour la glycérine et l'acidité volatile.

En étudiant l'action comparative des: sulfate, lactate, acétate, succinate, phosphate, nitrate de manganèse à des doses telles que la quantité de manganèse y soit la même, ces auteurs ont trouvé que le lactate et l'acétate se comportaient sensiblement comme le sulfate, que le phosphate et le succinate donnaient des teneurs en alcool plus faibles que les témoins, que le nitrate donnait des départs de fermentation très rapides et amenait une disparition du sucre aussi forte et même plus élevée que celle obtenue avec le sulfate.

Dans certaines expériences l'augmentation d'alcool a atteint jusqu'à 3 %.

Nous avons d'abord recherché quelle serait l'action du sulfate de manganèse employé à des doses de 0 gr. 5, 1 gr., 1 gr. 5 pour 1.000 cm³. Nous avons utilisé le milieu minéral, l'ensemencement a été fait à l'aide de levures 2 et 4. Les flacons ont été placés à l'étuve à 25°.

Ces deux levures se sont montrées très sensibles à l'action du sulfate de manganèse. La fermentation a été très longue à partir. L'analyse du liquide fermenté faite au bout de 34 jours montre que la quantité d'alcool produite est très faible et que l'action des doses employées a été nettement paralysante pour les deux levures, notamment pour la levure 4.

Milieu minéral

LEVURE	SO ⁴ MN EN GR. PAR LITRE	ALCOOL % EN VOLUME
2	tém. sans Mn	5°2
2	0 gr. 5	3°9
2	1 gr.	1°5
2	1 gr. 5	1°
4	tém. sans Mn	4°4
4	0 gr. 5	0°8
4	1 gr.	0°7
4	1 gr. 5	0°2

Dans un deuxième essai, nous avons employé des doses plus faibles de sulfate de manganèse: 0 gr. 05, 0 gr. 1, 0 gr. 2 0/00 et remplacé le milieu minéral par du moût de pommes.

La levure employée pour l'ensemencement a été la levure 2 (nous n'avons pu utiliser les deux levures faute d'une quantité suffisante de moût). Les flacons ont été placés à l'étuve à 25°; le dosage de l'alcool a été effectué au bout de 17 jours.

Moût de pommes

LEVURE	SO ⁴ MN EN GR. PAR LITRE	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT
2	tém. sans Mn	6°6	4 gr. 3
2	0, 05	6°6	3 gr. 8
2	0,1	6°5	3 gr. 8
2	0,2	6°3	3 gr. 6

Même à faible dose le sulfate de manganèse s'est encore montré défavorable.

Enfin dans un troisième essai nous avons étudié l'action comparative du chlorure, du sulfate et du nitrate de manganèse.

Les doses utilisées ont été celles correspondant au manganèse contenu dans 0 gr. 04 de sulfate de manganèse pour 1.000 cm³ de moût. Les résultats trouvés confirment les essais précédents.

SELS DE MN	ALCOOL % EN VOLUME	SUCRE RESTANT EN GR. PAR LITRE	ACIDITÉ TOTALE EN SO ⁴ H ²
Témoin . . .	6°6	2 gr. 9	3 gr. 5
Sulfate . . .	6°5	2 gr. 9	3 gr.
Chlorure. . .	6°5	3 gr. 3	2 gr. 9
Nitrate. . . .	6°0	3 gr.	3 gr.

Tous les sels de Mn ont exercé une action inhibitrice vis-à-vis des levures de poiré.

Il résulte de l'ensemble de ces résultats que les sels de Mn ne semblent pas être des composés susceptibles d'augmenter la production de l'alcool par les levures de poiré.

VI. - Résumé et conclusions

Au cours de ce travail nous avons étudié 25 levures de poiré, 23 appartiennent au genre *Saccharomyces* (Meyen), une au genre *Zygosaccharomyces* (Barker), une est un *Pseudosaccharomyces* (Klöcker).

Considérées dans leur ensemble, ces levures se distinguent des levures de bière et de vin par un certain nombre de caractères.

Cultivées en milieu liquide, elles ne donnent pas de voile, quelques-unes seulement des îlots de voile.

Les dimensions moyennes des cellules sont 8 μ pour la longueur et 6 μ pour la largeur.

Les colonies sur plaque de gélatine sont blanches, en forme de cône surbaissé, avec un cratère plus ou moins développé.

Elles sporulent facilement sur gélatine au moût, sur gélose, sur carotte, sur bloc de plâtre.

Pour certaines d'entre elles, on trouve même des spores dans les cellules des voiles, dans les cellules des dépôts.

A part deux exceptions, les spores se sont montrées acido-résistantes.

Les températures maxima de sporulation sont élevées, elles atteignent 36-38° pour cinq d'entre elles.

Les températures maxima de bourgeonnement sont également élevées: 45-46° pour 5 levures. Les températures minima sont comprises entre 0 et 3°.

La plupart résistent à une température de 60° en milieu liquide (eau de levure sucrée, contenant 2 0/00 d'acide malique).

Elles sont peu gênées par une dose d'acide malique atteignant 30 grs par litre.

Au point de vue fermentation, la température optimum est voisine de 29°.

Les quantités d'alcool produit ne dépassent guère 10°; une levure a cependant pu donner 12° d'alcool avec un moût enrichi en sucre.

Cette levure présente un certain intérêt pour la fermentation des moûts concentrés.

La rapidité de la fermentation varie sensiblement avec les différentes levures de poires.

Il en est de même pour la quantité de sucre nécessaire pour obtenir un degré d'alcool. Celle-ci a varié de 16 gr. 9 à 19 grs 3 avec les moûts de poires. De 16 grs 3 à 20 grs 2 avec les moûts de pommes.

Ces chiffres montrent tout l'intérêt qui s'attache à la sélection des levures au point de vue industriel. De bonnes levures peuvent augmenter sensiblement le rendement en alcool.

L'acidité volatile produite au cours de la fermentation est constituée principalement par de l'acide acétique mélangé d'un peu d'acide formique.

Les moûts de poires sont pauvres en azote, leur teneur est inférieure à 100 mmgrs par litre, il est nécessaire pour avoir des fermentations rapides et complètes, de leur ajouter des sels ammoniacaux.

Les doses de phosphate d'ammoniaque susceptibles de donner les meilleurs résultats au point de vue de la production de l'alcool, sont comprises entre 1 gr. et 1 gr. 5 0/00.

Le sulfate et le nitrate d'ammoniaque à teneur égale en azote, ont une action comparable à celle du phosphate.

Les sels de cuivre (sulfate, bimalate) employés à faible dose (0 gr. 02 à 0 gr. 05) ont une action stimulante sur la fermentation. Par contre les sels de manganèse ont une action inhibitrice.

L'étude des levures pures employées seules ou en combinaison, ne nous a pas donné de résultats concluants, mais les levures pures se sont toujours montrées supérieures au point de vue fermentation aux levures naturelles des fruits.

Bien qu'il ne soit pas possible d'étendre à la pratique industrielle, les conclusions trouvées à la suite de recherches de laboratoire, nous pensons que celles-ci peuvent donner d'utiles indications aux distillateurs et nous sommes convaincu que les levures pures de poires employées sous forme de pieds de cuve, sont susceptibles d'améliorer les rendements en alcool dans les distilleries de poires et de pommes; seuls des essais en grand, pourront justifier cette manière de voir.

VII. - Bibliographie

ABRÉVIATIONS

<i>Ann. B. et D.</i> ...	<i>Annales de la Brasserie et de la Distillerie.</i>
<i>Ann. I. P.</i>	<i>Annales de l'Institut Pasteur.</i>
<i>Bull. A. F. P.</i> ...	<i>Bulletin de l'Association française pomologique.</i>
<i>Bull. I. P.</i>	<i>Bulletin de l'Institut Pasteur.</i>
<i>Cent. f. Bakt.</i> ...	<i>Centralblatt für Bakteriologie.</i>
<i>C. F.</i>	<i>Cidrerie française (Revue pomologique).</i>
<i>C. R. Ac. Ag.</i> ...	<i>Comptes-rendus de l'Académie d'Agriculture.</i>
<i>C. R. Ac. S.</i>	<i>Comptes-rendus de l'Académie des Sciences.</i>
<i>C.R. Lab. Carlsb.</i>	<i>Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg.</i>
<i>C. R. S. B.</i>	<i>Comptes-rendus de la Société de Biologie.</i>
<i>Landw. Jahrb. Schweiz</i> ...	<i>Landwirtschaftliche Jahrbücher der Schweiz.</i>
<i>Rev. Vit.</i>	<i>Revue de Viticulture.</i>

1. BARKER (P.-A.). — Conjugating Yeast. Proceed of the Roy. Soc., 8 juillet 1901.
2. BEAUVERIE (J.). — Les méthodes de la biométrie appliquées à l'étude des levures. *C. R. S. B.*, 27 janvier 1912.
3. BEAUVERIE (J.). — Quelques propriétés des ascospores de levures. Technique pour la différenciation. *C. R. S. B. A LXXX*, 6 janvier 1917.
4. BEAUVERIE (J.). — Sur un *Zygosaccharomyces* de la datte isohétérogame. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, tome LVI, 2^{me} fascicule.
5. BERNIER. — La pomme en distillerie. *C. R. de la Semaine nationale du cidre, Paris* 1923.

6. BERTRAND (G.) et THOMAS (P.). — Guide pour les manipulations de chimie biologique. Dunod et Pinat, Paris 1919.
7. BOTTU (H.). — La nutrition azotée de la levure. *Thèse de pharmacien supérieur*, Paris 1908.
8. BOULLANGER. — Distillerie agricole et industrielle. Baillière, Paris 1924.
9. BURRI. — Das Tuschverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakteriologie. Iéna 1909.
10. CASTAN (P.). — Contribution à l'étude des levures de vin. *Annuaire agricole de la Suisse* 1927.
11. CHEVALLIER. — La culture du poirier à poiré dans la région de Domfront et son amélioration. *C. R. de la Semaine nationale du cidre*. Paris 1923.
12. DOP (P.) et GAUTIÉ (A.). — Manuel de technique botanique. Lamarre, Paris 1909.
13. DUCLAUX (E.). — Traité de microbiologie. Fermentation alcoolique, tome III, Paris 1900.
14. DUCLAUX (E.). — Sur le dosage des acides volatils. *Ann. I. P.*, 5-575, 1895.
15. DUCLAUX (E.). — Sur la fermentation des sucres divers. *Ann. I. P.*, 1892.
16. DUCLAUX (E.). — Sur la recherche des alcools supérieurs. *Ann. I. P.*, 1888.
17. DUJARDIN (J.). — Notice sur les instruments de précision appliqués à l'œnologie. Paris 1928.
18. EHRLICH (F.). — Sur les conditions de formations de l'huile de fusel, ses relations avec la synthèse des albuminoïdes chez la levure. *Ber. der deutsch chem. Gesellschaft* 40-1027, 1907 et *Ann. B. et D.* 10-129 et 221, 1907.
19. FERNBACH (A.). — L'acidification des moûts par la levure au cours de la fermentation alcoolique. *C. R., Ac. S.* 151-1004, 1910.
20. FERNBACH (A.). — L'augmentation de l'acidité produite par la levure au cours de la fermentation alcoolique. *Ann. B. et D.* 16-73, 1913.
21. GAYON (U.) et Laborde (J.). — Manuel pratique de l'analyse chimique des vins. Béranger, Paris 1912.

22. GIRARD (Ch.) et CUNIASSE (L.). — Manuel pratique de l'analyse des alcools et des spiritueux. Masson, Paris 1899.
23. GORODKOWA (A.). — Ueber das Verfahren rasch die Sporen von Hefepilzen zugevinnen. *Bull. Jard. Imp. Bot.*, Saint-Petersbourg 1908.
24. GUILLIERMOND (A.). — Les levures. Doin Paris 1912.
25. GUILLIERMOND (A.). — Clef dichotomique pour la détermination des levures. Le François, Paris 1928.
26. GUILLIERMOND (A.). — Recherches cytologiques sur levures. *Thèse-Sciences*, Paris 1902.
27. GUILLIERMOND. — Observations sur la germination des spores du *S. Ludwiggii*. *Bull. Soc. mycologie de France*, T. II, 1903.
28. HANSEN (E.-C.). — Chambre humide pour la culture des org. microsc. *C. R. lab. Carlsb.* T. III, 1881.
29. HANSEN (E.-C.). — Les ascospores chez le genre *Saccharomyces*. *C. R. lab. Carlsb.* T. I, liv. II, 1883.
30. HANSEN (E.-C.). — Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. Méthodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces*. *C. R. lab. Carlsb.* T. II, 1886.
31. HANSEN (E.-C.). — Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucres. *C. R. lab. Carlsb.* T. II, 1888.
32. HANSEN (E.-C.). — Sur la germination des spores des *Saccharomyces*. *C. R. lab. Carlsb.* T. III, 1891.
33. HANSEN (E.-C.). — Meddelser fra Carlsberg laboratoriet. T. V, 1900.
34. HARDEN (A.). — La fermentation alcoolique. Hermann Paris 1913.
35. HENNEBERG (W.). — Gärungsbakteriologisches Praktikum. Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde. Berlin 1909.
36. JOERGENSEN (A.). — Les microorganismes de la fermentation. 2^{me} édition française, Lamarre, Paris 1899.
37. KAYSER (E.). — Les levures. 2^{me} édition, Masson, Paris 1906.

38. KAYSER (E.). — Microbiologie appliquée à la transformation des produits végétaux et animaux. Baillière, Paris 1921.
39. KAYSER (E.). — Action de la chaleur sur les levures. *Ann. I. P.*, 3, 1889.
40. KAYSER (E.). — Influence des agents physiques et chimiques sur les levures. *Rev. Vit.* 36-89, 1911.
41. KAYSER (E.). — Etudes sur la formation du cidre. *Ann. I. P.*, 4, 1890.
42. KAYSER (E.). — Les levures sélectionnées dans les industries de fermentation. *Congrès de la pomme*, Rennes 1922.
43. KAYSER (E.). — Les microorganismes en cidrerie, *C. R. de la Semaine nationale du cidre*. Paris 1923.
44. KAYSER (E.) et MARCHAND. — Influence des sels de manganèse sur la fermentation alcoolique. *C. R. A. S.* 144 (574 et 716), 1907.
45. KAYSER (E.) et DELAVAL (H.). — Contribution à l'étude des poirés. *C. F.* 38 (120), 1926.
46. KAYSER (E.), RAY (G.), DELAVAL (H.). — Fermentation des poirés. *C. F.* 39 (69), 1927.
47. KAYSER (E.) et DELAVAL (H.). — Contribution à l'étude des cidres doux, *C. F.* 41 (7 et 73), 1929.
48. KAYSER (E.) et DELAVAL (H.). — Contribution à l'étude des levures de cidre. *C. F.* 42 (95), 1930.
49. KAYSER (E.) et DEMOLON (A.). — Contribution à l'étude des produits volatils de la fermentation alcoolique. *Ann. I. P.*, 1907 et 1909.
50. KAYSER (E.). — Défécation du moût de pommes et concentration en ions H. *C. F.* 37 (169), 1925.
51. KAYSER (E.). — Etude du moût de pommes. *C. R. Ac. Ag.* 13 (155), 1927.
52. KLÖCKER (A.). — Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe. Berlin, 1924.
53. KLÖCKER (A.). — In Lafar Handbuch der Technischen Mykologie. Vol. 4. Iéna, 1904 et 1905.
54. KLÖCKER (A.). — Fermentation organisms. A laboratory handbook. Londres, 1903.

55. KLÖCKER (A.). — Recherches sur les 17 formes de *Saccharomyces apiculatus*. *C. R. Lab. Carlsb.*, tome X, livre 4, 1913.
56. KUFFERATH (H.). — Quelques expériences sur la sporulation des levures. *Ann. B. et D.* 28 (354), 1930.
57. KUFFERATH (H.). — A propos des spores de *Pseudo-saccharomyces apiculatus* (Ress-Hansen). Klöcker. *Ann. B. et D.* 27 (177, 193, 209), 1929.
58. LAFAR (E.). — *Handbuch der technischen Mykologie*. Iéna, 1904-1914.
59. LEBLANC. — L'alcool neutre de cidre. *C. R. de la Semaine nationale du Cidre*. Paris, 1923.
60. LECHARTIER (G.) et BELLAMY (F.). — De la fermentation des fruits. *C. R. Ac. S.* 69 (466), 1869.
61. LÉVY (L.). — *Microbes et distillerie*. Gauthier-Villars. Paris, 1900.
62. LÉVY (L.). — L'alcool des pommes. *Ann. B. et D.* 27 (269), 1929.
63. LINDET. — Origine des alcools supérieurs dans les flegmes. Production de ces alcools en fin de fermentation. *C. R. Ac. S.* 112 (102 et 665), 1891, et 117 (122), 1893.
64. LINDNER. — Das Wachstum der Hefen auf festen Nährboden. *Wochenschrift. f. Brau.*, tome X, 1893.
65. LINDNER (P.). — *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*. Berlin, 1909.
66. LINDNER (P.). — *Atlas der Mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde*. Berlin, 1910.
67. LÖHNIS (F.). — *Précis de bactériologie agricole*. Traduction Kufferath. Bruxelles, 1912.
68. LÜERS (H.). — Le changement de la concentration en ions H. au cours de la fermentation. *Zeit. f. d. ges. Brauwesen*. 37 (79), 1914, et *Ann. B. et D.* 17 (107), 1914.
69. LÜTZ (L.) et GÜEGEN (F.). — De l'unification des méthodes de culture pour la détermination des mucédinées et des levures. *Bulletin de la Société mycologique de France*, tome XVIII, 1901.

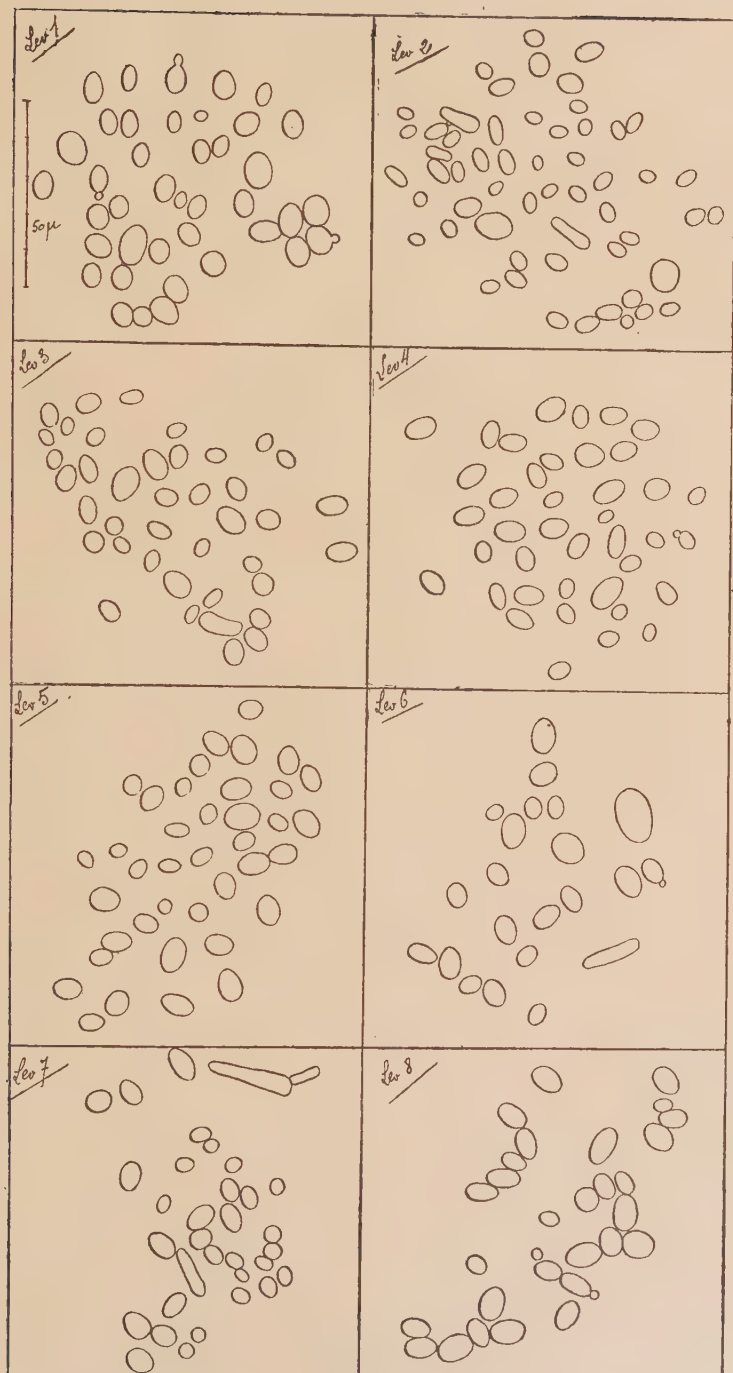
70. MARILLER. — Manuel du distillateur. Baillière, Paris, 1923.
71. MARILLER. — Quelques observations sur la distillerie de pommes. *Ann. B. et D.* 28 (249), 1930.
72. MARCHAND (H.). — La conjugaison des spores chez les levures. *Revue générale de Botanique*, 25 (207), 1913.
73. MARTIN. — Détermination chimique du degré alcoolique des vins. *Moniteur scientifique du Docteur Quesneville*, 59 (570), 1903.
74. MICHAËLIS (L.). — Détermination de l'acidité dans les industries de fermentation. *Ann. B. et D.* 27 (1), 1921.
75. MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER (A.). — Zuchtung und Prüfung neuer Obstweinhaefen. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1908.
76. MUSSO (L.). — Contribution à l'étude des levures algériennes. *Thèse sciences Paris*, 1913.
77. NADSON. — *C. R. S. B.*, 1925, page 423.
78. NÉGRONI. — *Archives de Parasitologie*, 1930.
78. NICOLAU (S.). — Les nitrates dans la vie de la levure. *Thèse sciences Paris*, 1924.
80. NITESCU (M.). — Contribution à l'étude des levures roumaines. *Thèse sciences Paris*, 1915.
81. OPPENHEIMER (C.). — Die Fermente. Leipzig, 1903.
82. OSTERWALDER (A.). — Über Schwefelwasserstoffbildung in Obst und Traubenweinen. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1902.
83. OSTERWALDER (A.). — Beiträge zur morphologie einiger Saccharomyceten-Arten insbesondere zur kenntnis unserer Obstweinhaefen. *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1903.
84. OSTERWALDER (A.). — Weitere Beiträge zur Kenntnis unsere Obstweinhaefen. *Cent. f. Bakt.*, tome XVI, 1. Abt. 1906.
85. OSTERWALDER (A.). — Neue aus Obst und Traubensäften gewonne Saccharomyces-Arten. *Cent. f. Bakt.*, tome 60, 2. Abt. 1924.
86. PASTEUR (L.). — Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Physique et de Chimie*, 58 (323), 1860.

87. PASTEUR (L.). — Production constante de la glycérine dans la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. S.*, 46 (857), 1858.
88. PEARCE (B.) et BARKER (P.). — The Yeast Flora of Bottled ciders. *The Journal of Agricultural Science*, tome III, 1903.
89. PERRIER (D^r). — Sur un mode de préparation des moûts de pommes pratiquement stériles. *Congrès de la pomme*, Rennes, 1922.
90. PETIT. — Alimentation azotée de la levure. *Chimie et Industrie*, 16 (121), 1926.
91. PIQUE (R.). — Le travail de la pomme en distillerie. *Chimie et Industrie*, numéro spécial, mai 1924.
92. PRINGSHEIM. — Influence de la constitution chimique de l'aliment azoté sur le pouvoir ferment de la levure. *Ann. B. et D.*, 10 (107 et 231), 1907.
93. RAY (G.). — La fabrication de l'alcool neutre et à haut degré par la distillation des pommes. *C. F.*, 36 (28), 1924.
94. RAY (G.). — Progrès à réaliser en distillerie de pommes. *C. F.*, 39 (206), 1927.
95. RONA (P.). — Praktikum der Physiologischen Chemie. Ester Teil. Fermentmethoden. Berlin, 1926.
96. SCHILLER. — Recherches sur la fermentation élective. *Thèse sciences Paris*, 1924.
97. SCHOEN. — Le problème de la fermentation. Masson, Paris, 1926.
98. SCHRYVER (S.) et Mlle THOMAS. — Les constituants azotés du moût et leur assimilation par la levure. *Ann. B. et D.*, 28 (231), 1930.
99. SCHWEIZER (Ch.). — Etudes sur la fermentation des cerises. *Ann. I. P.*, tome XXXV, 1921.
100. STEINER. — Les levures actives des vins valaisans. *Thèse sciences Genève*, 1924.
101. STERN (A.). — La nutrition de la levure. *Journal of the chem. Soc.*, tome LXXV, p. 201, et tome LXXIX, p. 243.
102. THOMAS (P.). — Sur la nutrition azotée de la levure. *C. R. Ac. S.*, tome LXXXI, 1901.

103. TRIANDAFIL (D.). — Contribution à l'étude des échanges entre les cellules de levure et le milieu. *Thèse sciences Paris*, 1924.
 104. TRUELLE (A.). — L'art de reconnaître les fruits du pressoir. Garnier, Paris, 1893.
 105. TRUELLE (A.). — Le poiré. *Semaine nationale du Cidre*. Paris, 1923.
 106. TRUELLE (A.). — Les principales poires à poiré du Pays d'Auge. *Bulletin A. F. P.*, 42 (92), 1924.
 107. TRUELLE (A.). — Les poirés pur jus du Pays d'Auge. *Bull. A. F. P.*, 42 (127), 1924.
 108. TRUELLE (A.). — Analyses comparatives de poires à poiré, à deux fins et de table. *C. R. Ac. Ag.*, 13 (387), 1927.
 109. VENTRE. — Influence des levures et de la constitution initiale des moûts sur l'acidité des liquides fermentés. *Ann. B. et D.*, 16 (493), 1913.
 110. VENTRE. — Influence des différentes espèces de Saccharomyces sur milieux artificiels et naturels. *Ann. I. P.*, tome XXVIII.
 111. WARCOLLIER (G.). — Pomologie et cidrerie. Baillière, Paris, 1920.
 112. WARCOLLIER (G.). — Les industries de la pomme, leur avenir. *C. F.*, 40 (331 et 369), 1928.
 113. WARCOLLIER (G.). — Progrès réalisés en cidrerie depuis 1913. *C. F.*, 38 (329), 1926, et 39 (3), 1927.
 114. WARCOLLIER (G.) et LE MOAL. — Documents sur la composition des eaux-de-vie de cidre. *Annales des Falsifications*, décembre 1910.
-

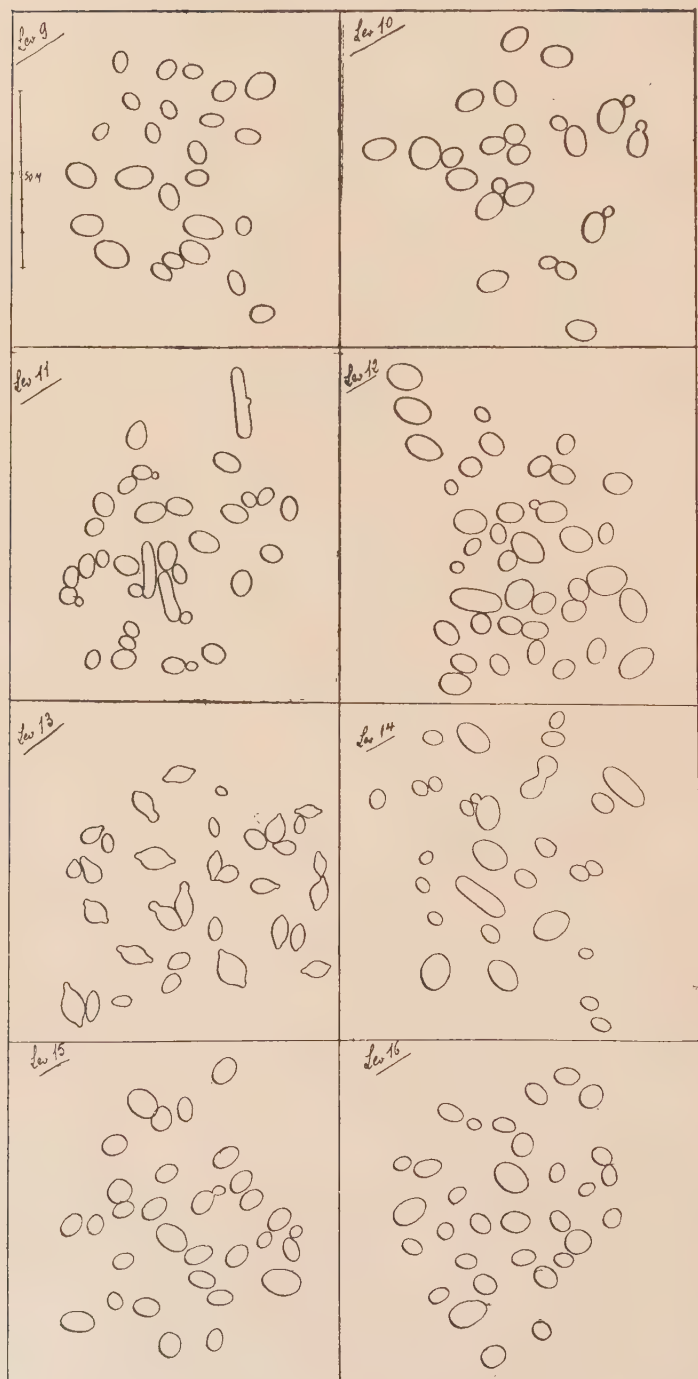
Morphologie des cellules

PLANCHE I



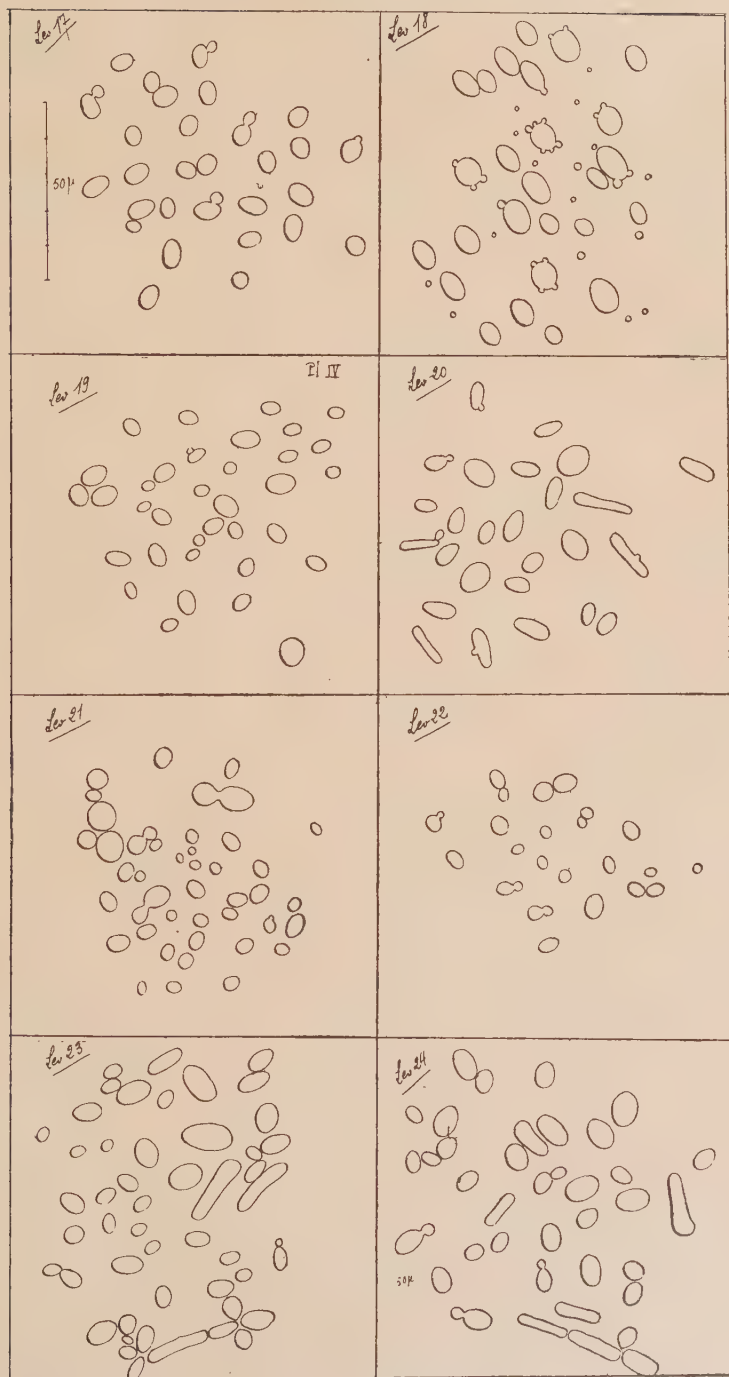
Morphologie des cellules

PLANCHE II



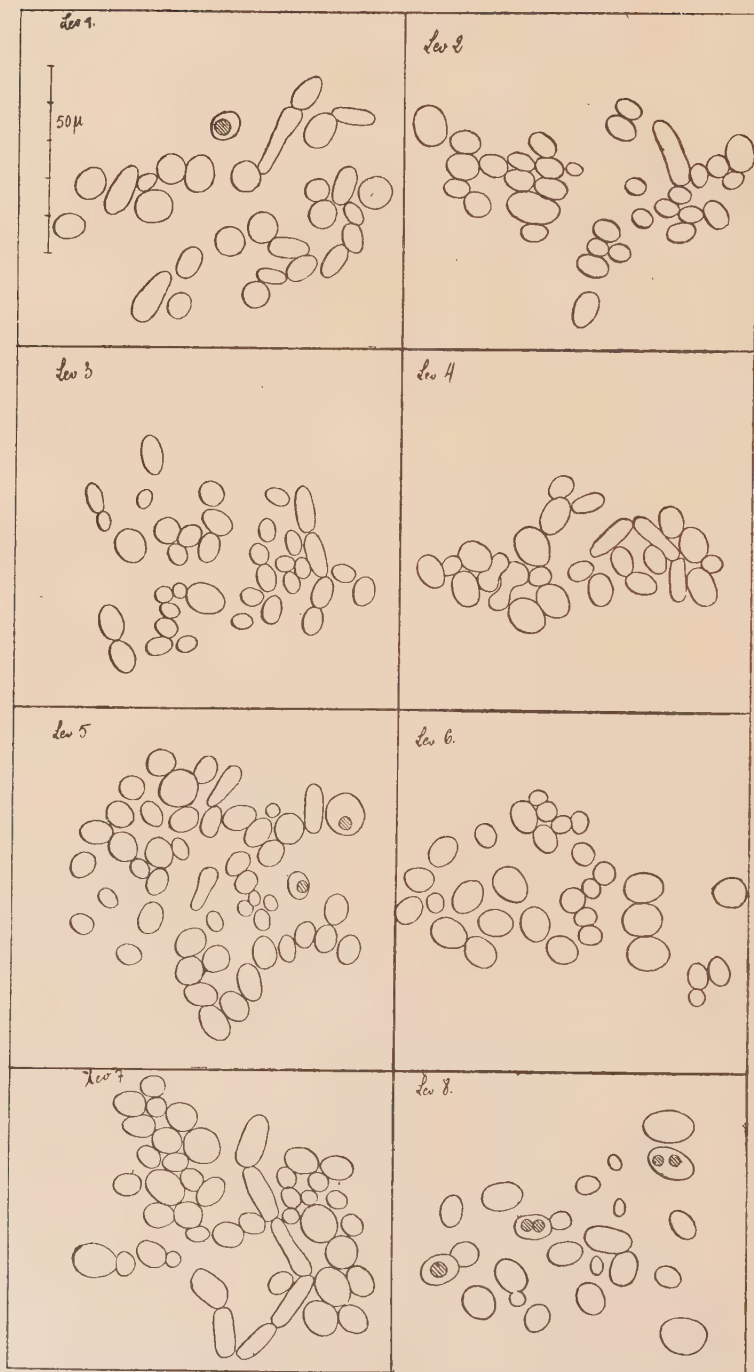
Morphologie des cellules

PLANCHE III



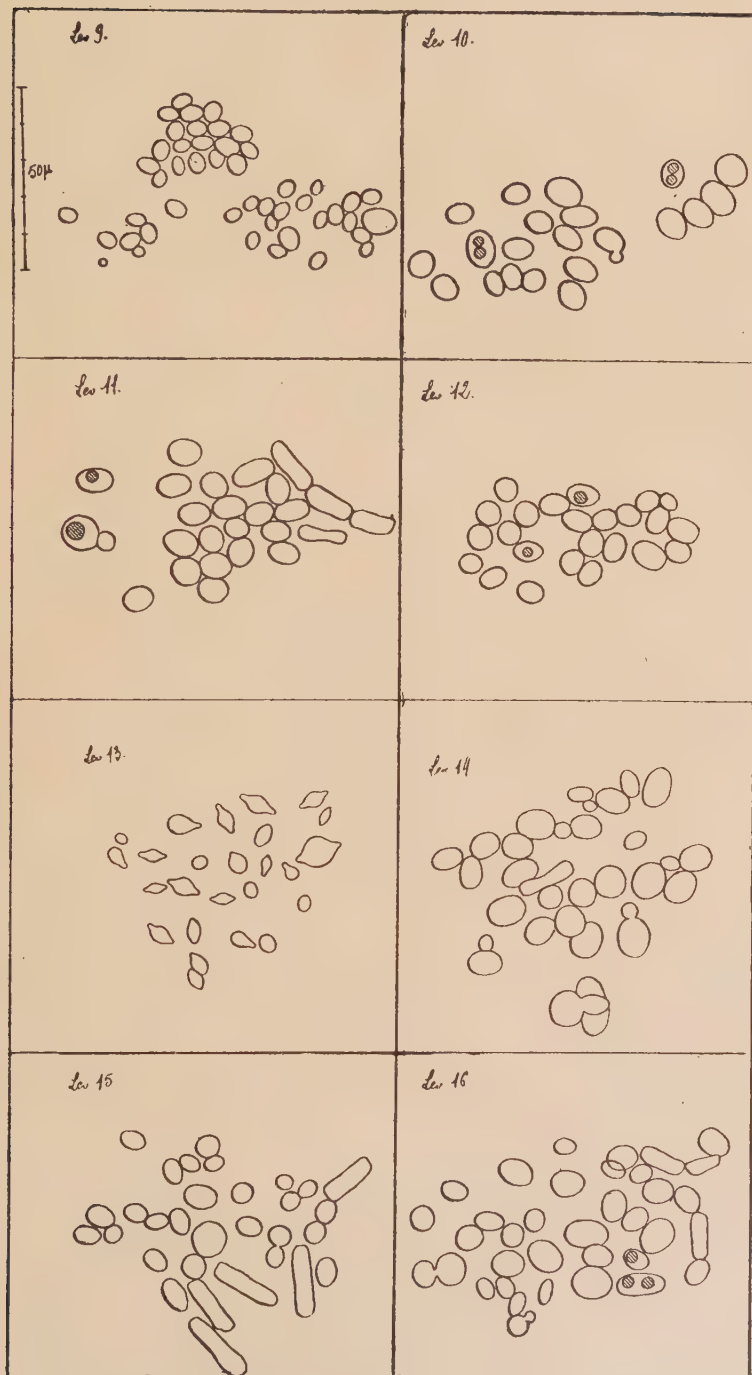
Cellules de la végétation de dépôt

PLANCHE IV

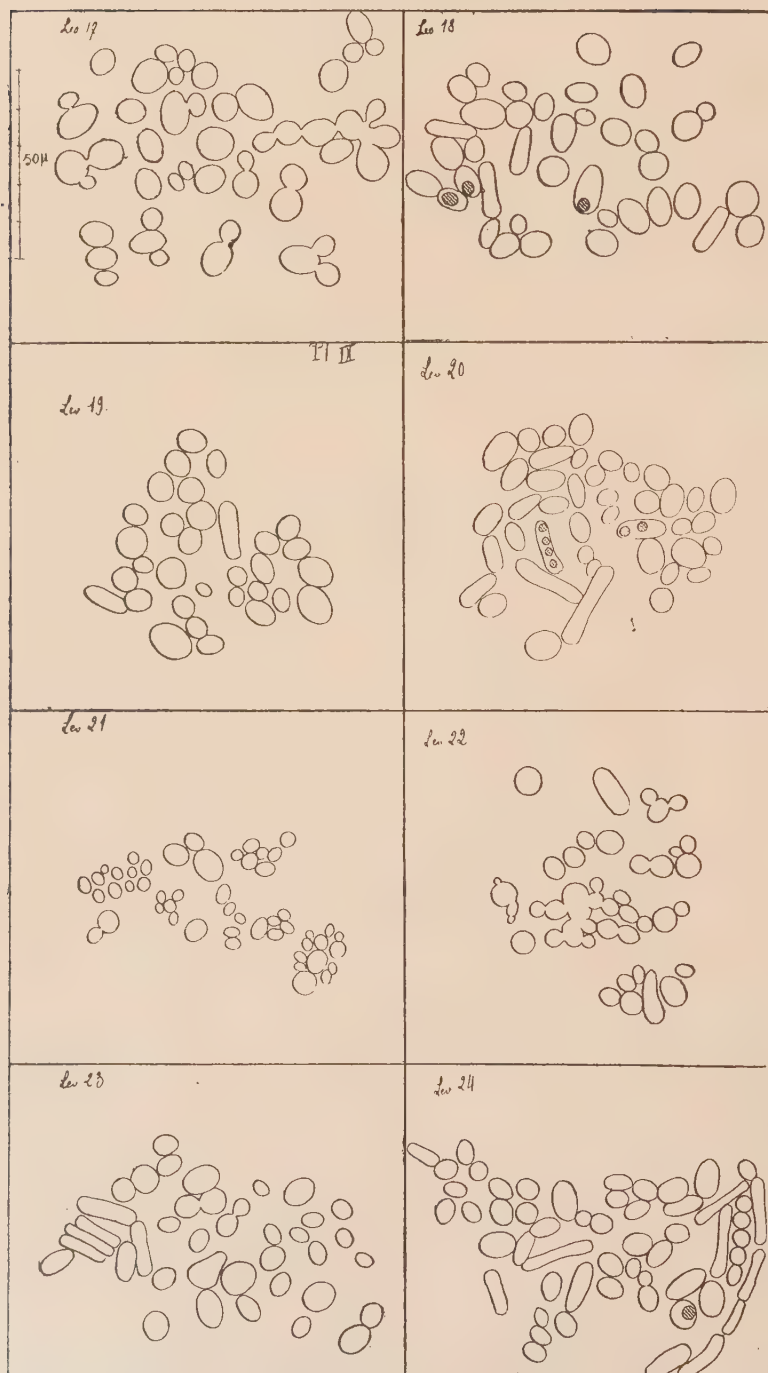


Cellules de la végétation de dépôt

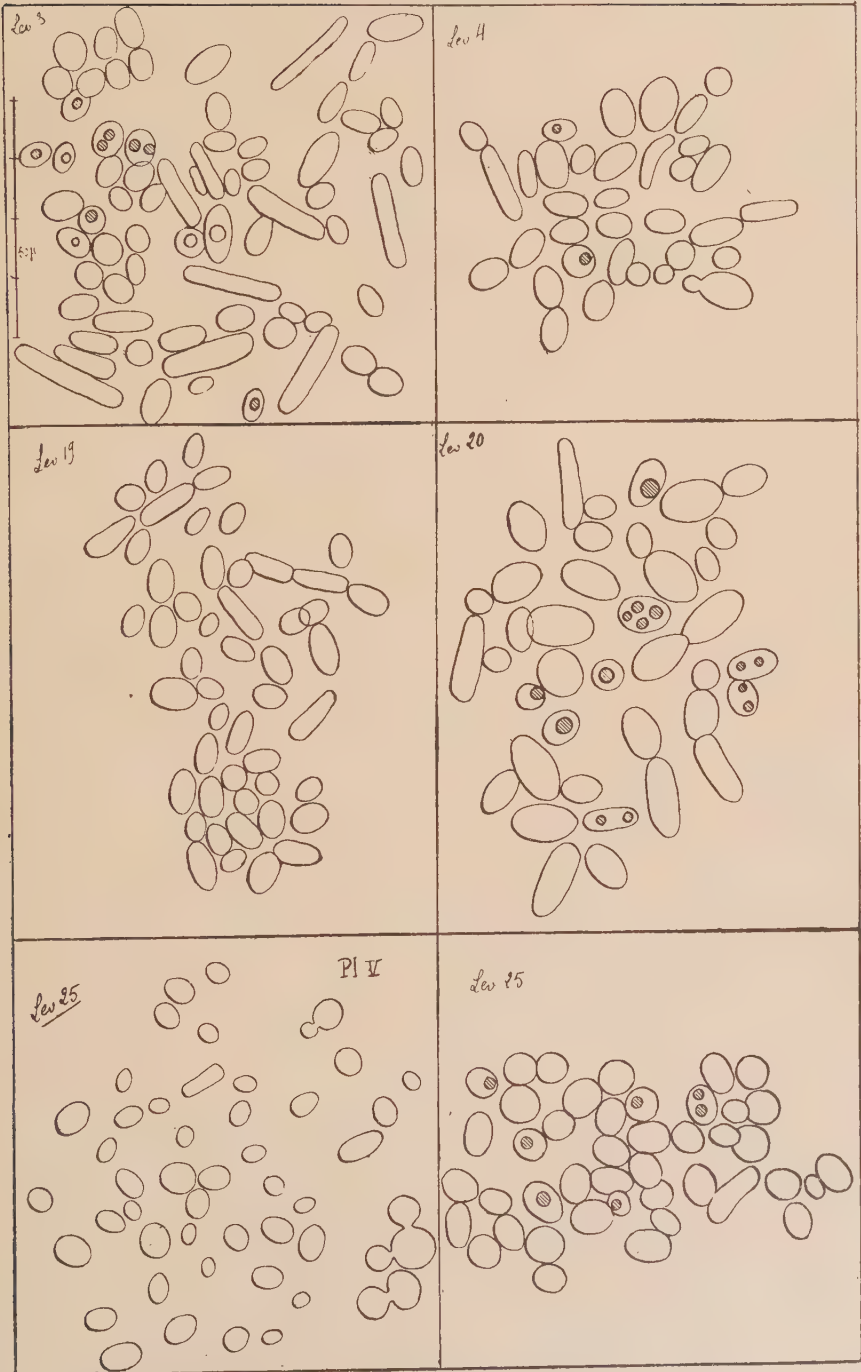
PLANCHE V



Cellules de la végétation de dépôt



Cellules des voiles

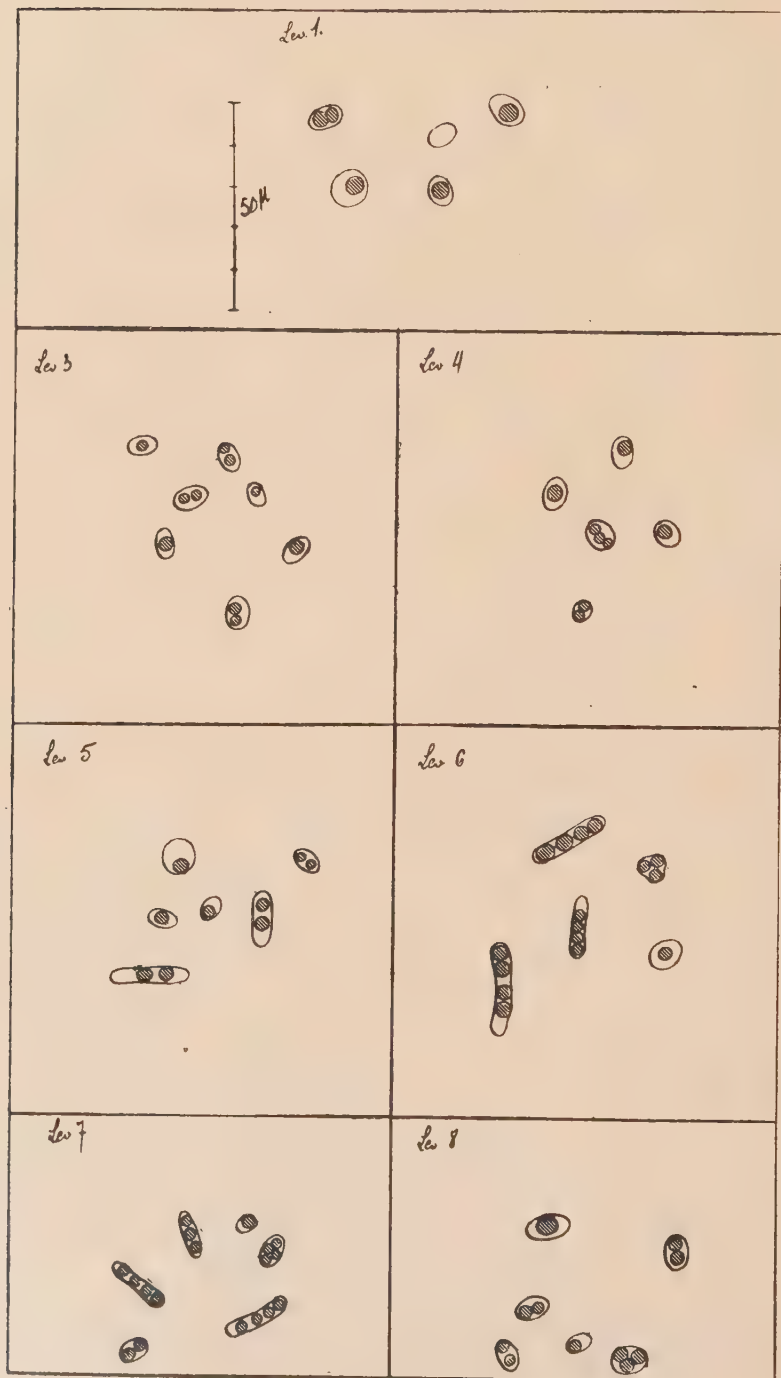


LEVURE 25

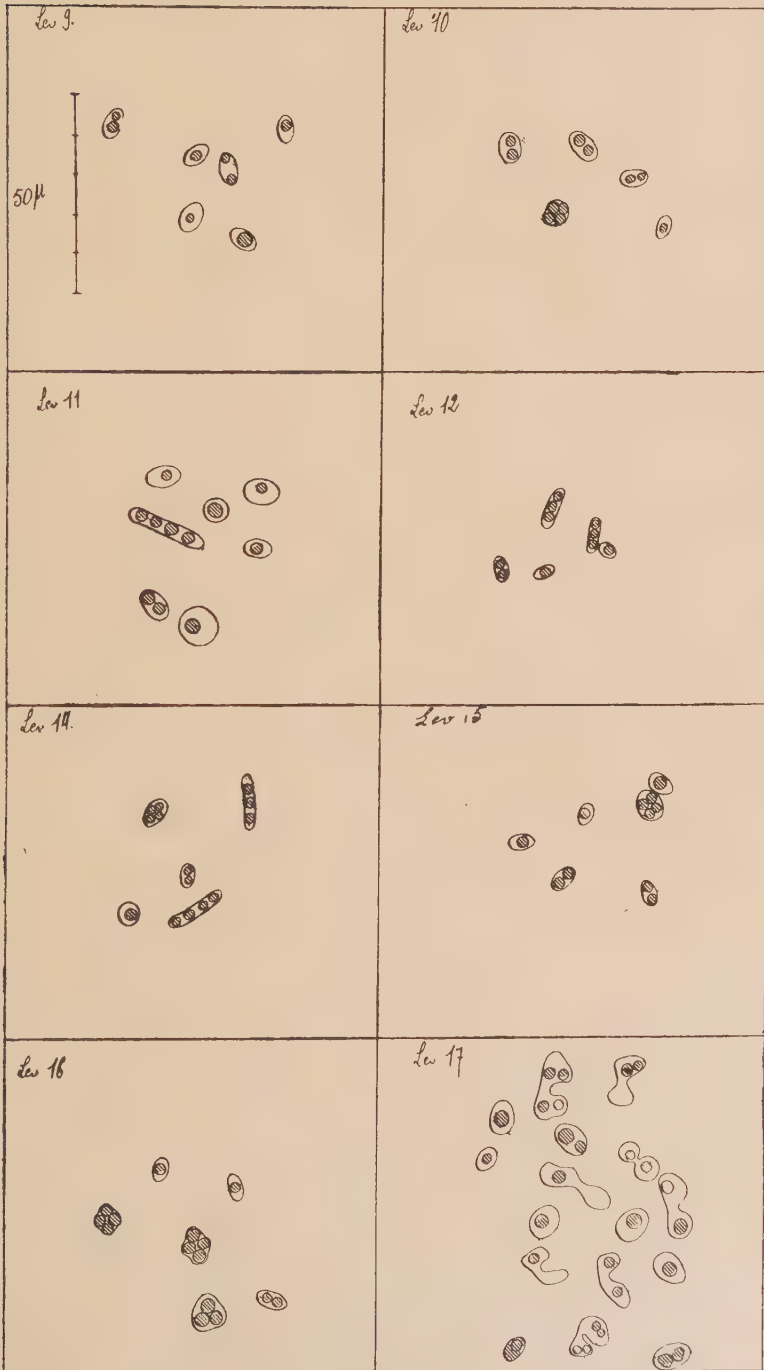
Morphologie des cellules

Végétation de Dépôt

Sporulation. Cultures en stries sur gélose (7 mois)



Sporulation. Cultures en stries sur gélose (7 mois)

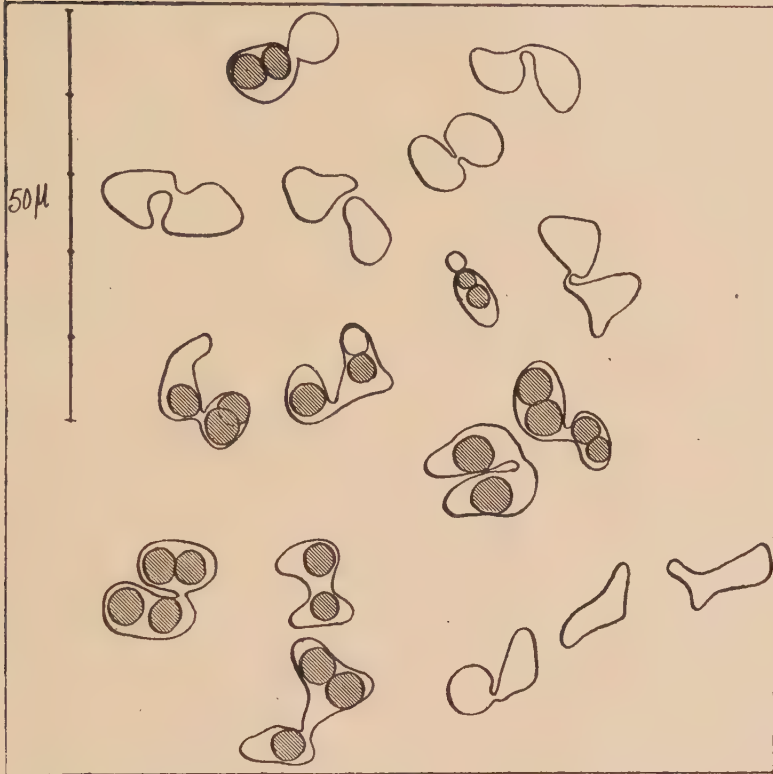


Sporulation. Cultures en stries sur gélose (7 mois)



Levure 17

I. Sporulation sur carotte au bout de 69 h. à 28°

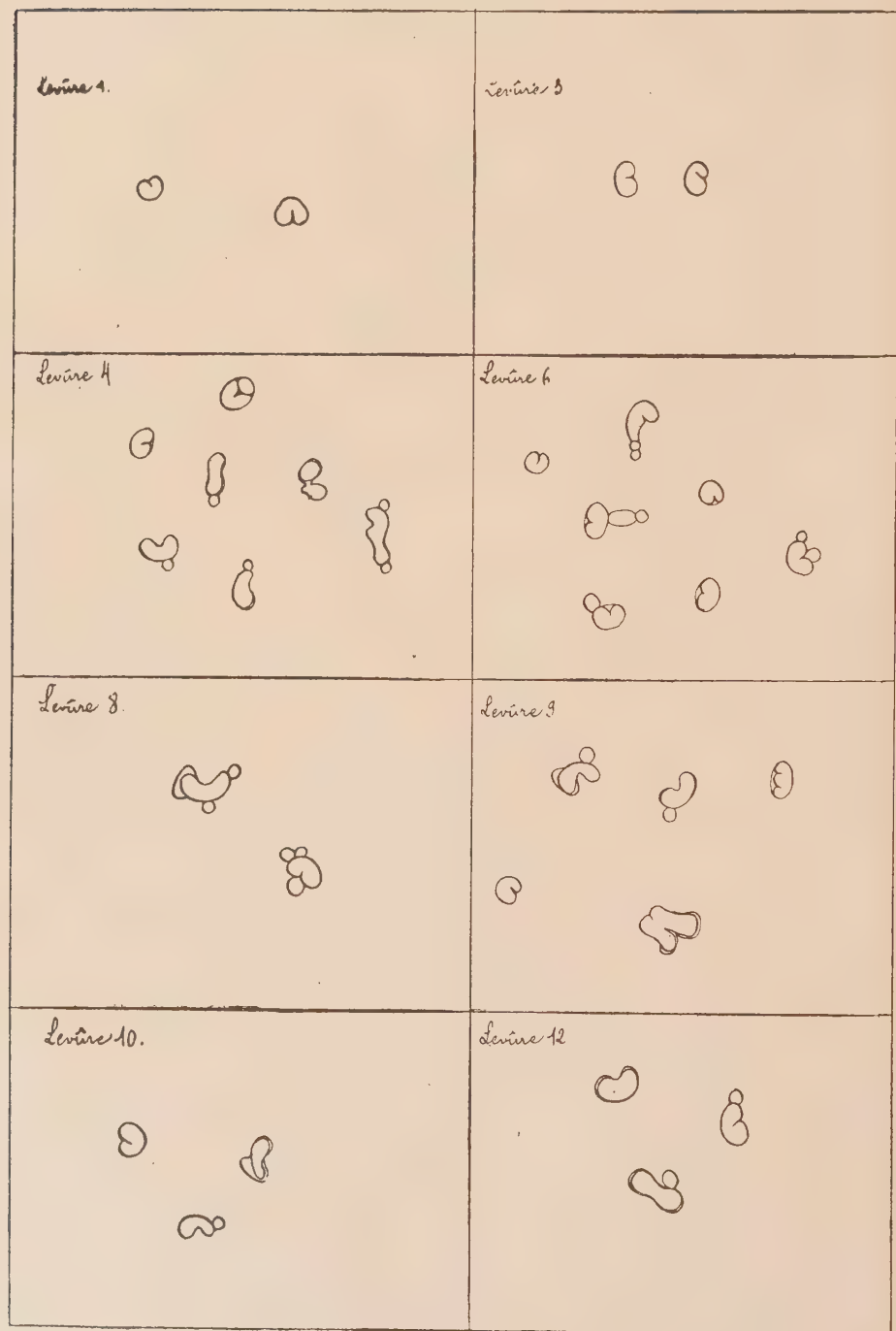


Levure 22

II. Culture sur carotte âgée de 35 jours



Germination des ascospores



Germination des ascospores

Levure 16.



Levure 18.



Levure 20.



Levure 25.



I



I



I



II



I



II

Levure 3.

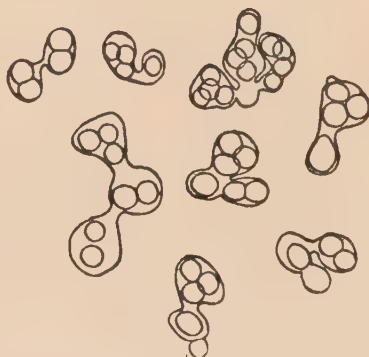
Transformation directe des ascospores en asques



levûre 1



levûre 9



levûre 10.



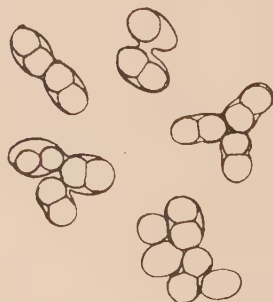
levûre 18



levûre 20

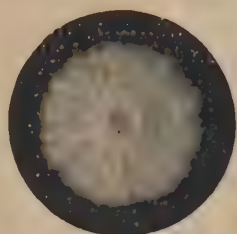


levûre 24

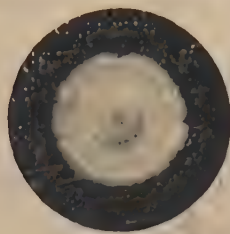


levûre 25

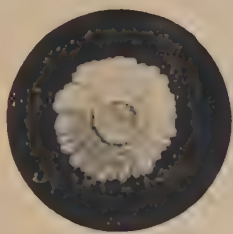
Colonies géantes



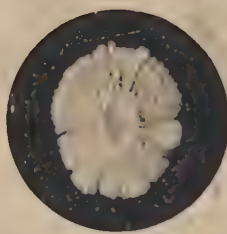
8



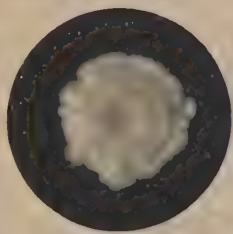
21



1



4



17



13

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.	7
I. — <i>Isolement des levures</i>	13
Origine des levures isolées	13
Technique de l'isolement	14
Milieux de culture	22
II. — <i>Etude morphologique</i>	25
Morphologie des cellules	25
Aspect de la végétation de dépôt	27
Formation des voiles et des anneaux	29
Cultures en stries sur gélatine	30
Colonies géantes	33
Formation des ascospores (températures limites et opti- ma, acido-résistance, germination des ascospores)..	35
Températures limites de bourgeonnement	49
III. — <i>Etude physiologique</i>	51
Résistance à la chaleur. — Température mortelle	51
Température optimum de fermentation	54
Maximum d'alcool produit	56
Résistance à l'acidité	60
Action sur les sucres	63
IV. — <i>Description des espèces</i>	71

V. — <i>Etude complémentaire de la fermentation</i>	95
Coefficient d'utilisation du sucre	96
Acidité produite au cours de la fermentation (acidité totale, acidité volatile, nature de l'acidité volatile) ..	99
Fermentation de moût de poires dilué analogue à ceux utilisés dans l'industrie	103
Fermentation produite par une levure unique ou l'association de deux levures	106
Influence de l'aliment azoté sur la vitesse de fermentation et la production de l'alcool	110
Action des sels de cuivre sur la fermentation	118
Action des sels de manganèse	121
VI. — <i>Résumé et conclusions</i>	125
VII. — <i>Bibliographie</i>	129
PLANCHES I A XV	137 à 151

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° Les microorganismes fixateurs d'azote

2° Les phosphates de la France
et de l'Afrique du Nord

Lu et accepté :

LES MEMBRES DU JURY,

CARDOT.

ROMAN.

DOUIN.

FROMAGEOT.

Vu et approuvé :

LE DOYEN DE LA FACULTÉ

DES SCIENCES DE LYON,

MEMBRE DE L'INSTITUT,

V. GRIGNARD.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 18 Novembre 1930.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

JOSEPH GHEUSI.



IMP. BOSC FRÈRES & RIOU

• 42, QUAI GAILLETON •

• • • • • LYON • • • • •



